

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas

**Efeito da desintegrina recombinante DisBa-01 incorporada
em micelas ou livre em células portando ou não a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$**

Lívia Carolina de Abreu Ribeiro

Araraquara,
Novembro de 2013

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas
Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**Efeito da desintegrina recombinante DisBa-01 incorporada
em micelas ou livre em células portando ou não a integrina $\alpha v \beta 3$**

Doutoranda: Livia Carolina de Abreu Ribeiro

Orientadora: Profª. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Área de Concentração Imunologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor.

Araraquara,
Novembro de 2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- Ribeiro, Livia Carolina de Abreu
R484 Efeito da desintegrina recombinante DisBa-01 incorporada em micelas ou livre em células portando ou não a integrina $\alpha v \beta 3$ / Livia Carolina de Abreu Ribeiro. – Araraquara, 2013
113 f.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Iracilda Zeppone Carlos
1. Integrina $\alpha v \beta 3$. 2. Micela. 3. Câncer. 4. VEGF . I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Auxílio: 2010/05428-0; Bolsa de Estudos: 2010/01568-2



Agradecimentos

*Ao **Tempo**, que me moldou e me deu calma, coragem e persistência e a **Deus**, em nome do que eu ainda não sei, em nome da crença que tive em que tudo daria certo, em nome do acaso, da sorte, e de algo mais...*

*À minha **Família**, que sempre esteve ao meu lado, com compreensão, atenção e amor, que me ajudou em cada etapa a ser cumprida. Esta conquista é de vocês também!*

*À minha **Orientadora** Iracilda Zeppone Carlos, por ter me acolhido em seu laboratório, pela confiança depositada, pela tutela, pelo seu bom humor! Obrigada!*

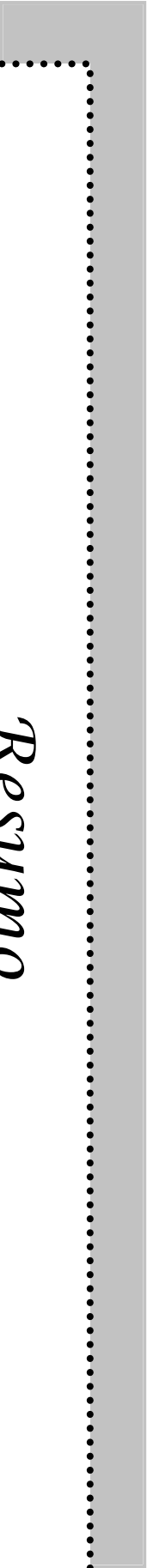
*Aos **Amigos** presentes no dia-a-dia do laboratório e aos que estão distantes, que me alegraram, confortaram e me ajudaram constantemente ao longo deste trabalho. Vocês fizeram o cotidiano interessante, a batalha mais leve e as conquistas mais valiosas!*

À Marisa Campos Polési Pláceres por me ajudar em todas as dúvidas que eu tive e por me deixar trabalhar com você! À nossa maneira, fomos uma equipe em muitos momentos! O agradecimento aos amigos também foi feito para você!

*Aos **Colaboradores** deste trabalho: a Heloísa S. Selistre de Araújo e à equipe da UFSCAR que me concederam a proteína-alvo e o conhecimento para produzi-la, a Ana Paula Ulián de Araújo, à equipe da Farmacotécnica, aos alunos da Química, a Leila Chiavacci, a Livia Contini Massimino. Sem vocês, este trabalho não poderia ter sido realizado! Obrigada!*

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio de pesquisa e pela bolsa concedida.

"O câncer é, de fato, um fardo construído em nosso genoma,
o contrapeso de chumbo das nossas aspirações de imortalidade."
(Siddhartha Mukherjee, no livro "O Imperador de Todos os Males")



Resumo

RESUMO

Introdução: a integrina $\alpha\beta3$ causa adesão celular à vitronectina e está expressa em diversos tumores humanos, mas está em níveis muito reduzidos nos tecidos normais, sendo mais notável em células derivadas da medula óssea. A desintegrina recombinante DisBa-01 se liga à integrina $\alpha\beta3$, inibindo a adesão celular à vitronectina. Apresenta também uma capacidade antimetastática *in vivo* e antitrombótica *in vitro*. As micelas são sistemas de transporte que podem direcionar o fármaco ao tecido alvo de forma passiva, se acumulando onde a microvasculatura esteja mais permeável, como no caso do câncer. **Objetivos:** verificar a perda de adesão, a liberação de mediadores, a citotoxicidade e a *anoikis* gerados pela desintegrina DisBa-01, tanto em sua forma livre como incorporada em micelas, em linhagens celulares que expressem ou não a integrina $\alpha\beta3$. **Métodos:** a desintegrina foi expressa em bactérias *Escherichia coli* a partir de um cDNA fusionado ao vetor pET28a, e então purificada por cromatografias e diálises. As micelas controle (M-C) ou contendo a desintegrina (M-DB) foram estruturadas com polissorbato 80 e fosfatidilcolina de soja, e foi observado o diâmetro médio e índice de polidispersidade por espalhamento dinâmico de luz, o potencial zeta por microeletroforese, a eficiência de encapsulação por dosagem protéica de Lowry, a avaliação estrutural da desintegrina encapsulada por espectroscopias de dicroísmo circular e de fluorescência e a estrutura das micelas pela curva de SAXS. As micelas e a proteína livre foram testadas em linhagens HUVEC e SC, contendo a integrina $\alpha\beta3$, e K562, não contendo esta integrina. Foram avaliados a citotoxicidade pelo teste de MTT, a inibição de adesão celular ou descolamento a vitronectina e fibronectina por quantificação das células aderidas com cristal violeta, a *anoikis* por observação das células viáveis e em apoptose se aderidas ou não por MTT, Apo-Direct e anexina V, e a

liberação de mediadores VEGF-A, IL-8, TGF- β , TNF- α , IL-12 e IL-10 por ELISA. A análise estatística foi realizada por um método de análise de variância seguido de um teste de comparações múltiplas, com a significância sendo considerada $p < 0,05$.

Resultados: M-DB apresentou um maior diâmetro médio e um potencial zeta mais positivo, mas um índice de polidispersidade similar a M-C, e uma encapsulação de $27,54 \pm 5,21\%$ da proteína dispersa em solução. Não houve alteração estrutural da proteína após encapsulação e a curva de SAXS apresenta o perfil esperado para o sistema de micela. Nas linhagens celulares, a desintegrina livre ou incorporada em micelas apresentou citotoxicidade apenas para HUVEC e após 48 horas de exposição, com significativa inibição de adesão nesta linhagem frente a vitronectina e possível *anoikis*. Houve produção de VEGF-A pelas células SC frente a DisBa-01 livre, mas não quando incorporada em micelas, e produção de TGF- β para HUVEC frente a desintegrina livre, e para SC frente às micelas M-C e M-DB. **Conclusões:** a inibição de adesão e *anoikis* tornam esta desintegrina interessante ao tratamento adjuvante no câncer, mas devido à produção de mediadores, os possíveis benefícios precisam ser analisados para cada paciente individualmente.

Palavras-chave: integrina $\alpha v \beta 3$, micela, câncer, VEGF



Abstract

ABSTRACT

Introduction: integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ sustain cellular adhesion to vitronectin and is expressed on a diversity of human tumors but is present at very low levels on normal tissues, with notable expression on bone marrow-derived cells. The recombinant disintegrin DisBa-01 binds to $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin, inhibiting cell adhesion to vitronectin. It also features an *in vivo* anti-metastatic ability and *in vitro* anti-thrombotic function. Micelles are a transport system that can direct a drug to the target tissue passively, accumulating where microvasculature is more permeable, which happens on cancer. **Objectives:** to verify adhesion loss, mediators production, cytotoxicity and *anoikis* generated by disintegrin DisBa-01, both in its free form or incorporated into micelles, in cell lines expressing or not $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin. **Methods:** the disintegrin was expressed in *Escherichia coli* using a cDNA fused to vector pET28a, and then purified by chromatography and dialyses. Control micelles (M-C) or containing disintegrin (M-DB) were assembled using polysorbate 80 and soy phosphatidylcholine, and it was observed the average diameter and polydispersity index by dynamic light scattering, zeta potential by microelectrophoresis, the efficiency of encapsulation by protein determination using Lowry reagent, structural assessment of disintegrin encapsulated by circular dichroism spectroscopy and fluorescence spectroscopy and micelles' structure by SAXS curve. The protein free or incorporated into micelles were tested in HUVEC and SC, containing integrin $\alpha\text{v}\beta 3$, and in K562, not containing this integrin. Cytotoxicity was evaluated by MTT assay, inhibition of cell adhesion and detachment to vitronectin or fibronectin by quantifying the adherent cells with crystal violet, the *anoikis* by observation of viable cells and apoptosis, whether attached or not, by MTT, Apo-Direct and annexin V, and production of mediators VEGF-A, IL-8, TGF- β , TNF- α , IL-12 and

IL-10 by ELISA. Statistical analysis was performed by a method of analysis of variance followed by multiple comparisons test, significance is considered $p < 0.05$. **Results:** M-DB presented a greater mean diameter and a zeta potential more positive but a polydispersity index similar to M-C, and displayed an encapsulation of $27.54 \pm 5.21\%$ of protein dispersed in solution. There was no structural alteration of the protein after encapsulation and SAXS curve shows the expected profile for the micelles. In cell lines, the disintegrin free or incorporated into micelles showed cytotoxicity to HUVEC only after 48 hours of exposure, with significant inhibition of adhesion to vitronectin for this lineage and possible *anoikis*. The VEGF-A production by the cells SC was caused by DisBa-01 free, but not when incorporated into micelles, and TGF- β production by HUVEC was triggered by free disintegrin, and by SC was caused by micelles M-C and M-DB. **Conclusions:** adhesion inhibition and *anoikis* make this disintegrin interesting as an adjuvant treatment in cancer, but due to production of mediators, the potential benefits should be analyzed for each individual patient.

Keywords: integrin $\alpha v \beta 3$, micelle, cancer, VEGF



Índices

SUMÁRIO

Agradecimentos

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA E FIGURAS.....	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Integrinas.....	23
1.2. A integrina $\alpha v\beta 3$	24
1.3. O câncer e seus tipos celulares.....	26
1.4. Mediadores solúveis e o câncer.....	27
1.5. Integrinas em tumores malignos.....	29
1.6. Desintegrinas.....	31
1.7. Micelas.....	32
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1. Delineamento experimental.....	40
3.2. Obtenção da desintegrina recombinante DisBa-01.....	41
3.2.1. Expressão da desintegrina.....	41
3.2.2. Purificação e concentração da desintegrina recombinante DisBa-01.....	42
3.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio.....	43
3.3. Preparo das micelas.....	43

3.4. Caracterização das micelas.....	44
3.4.1. Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica.....	44
3.4.2. Determinação do potencial zeta.....	45
3.4.3. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	45
3.5. Eficiência de encapsulação.....	46
3.5.1. Separação de proteínas contidas no solvente da suspensão de micelas.....	46
3.5.2. Dosagem protéica.....	46
3.6. Caracterização estrutural da desintegrina incorporada em micelas.....	47
3.6.1. Espectroscopia de fluorescência.....	47
3.6.2. Espectroscopia de dicroísmo circular.....	47
3.7. Teste qualitativo para endotoxinas.....	48
3.8. Linhagens celulares.....	48
3.9. Preparo das placas de cultura sensibilizadas.....	49
3.10. Ensaio de citotoxicidade.....	50
3.11. Ensaio de inibição da adesão celular.....	51
3.12. Ensaio de descolamento celular.....	52
3.13. Quantificação celular por cristal violeta.....	52
3.14. Observação da <i>anoikis</i>	53
3.14.1. Ensaio de citotoxicidade celular em células aderidas ou não aderidas.....	53
3.14.2. Preparo das células para os testes de apoptose.....	54
3.14.3. Apoptose por anexina V.....	55
3.14.4. Apoptose por Apo-Direct.....	55
3.15. Produção de mediadores em presença de vitronectina ou fibronectina.....	56
3.16. Produção de mediadores em presença das formulações contendo a	

desintegrina recombinante	56
3.17. Análise estatística.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1. Obtenção da desintegrina recombinante DisBa-01.....	60
4.2. Caracterização das micelas.....	63
4.3. Avaliação do perfil de SAXS.....	66
4.4. Eficiência de encapsulação.....	67
4.5. Avaliação estrutural da proteínas por espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de dicroísmo circular.....	69
4.6. Citotoxicidade celular.....	69
4.7. Inibição da adesão celular.....	72
4.8. Descolamento celular.....	77
4.9. <i>Anoikis</i>	80
4.9.1. Viabilidade celular por MTT em células aderidas ou não.....	80
4.9.2. Apoptose em células aderidas e não aderidas.....	83
4.10. Quantificação de mediadores após a adesão celular.....	87
4.11. Quantificação de mediadores após exposição à desintegrina.....	90
5. CONCLUSÕES.....	100
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Tabela 1. Características das micelas contendo (M-DB) ou não (M-C) a desintegrina DisBa-01.....	64
Figura 1. As diferentes integrinas e seus principais ligantes.....	25
Figura 2. Atuação da desintegrina recombinante DisBa-01.....	25
Figura 3. Diferenças entre micelas contendo ou não lipídeos.....	35
Figura 4. Sequência de códons e aminoácidos correspondentes à desintegrina recombinante DisBa-01 que foi inserida no plasmídeo pET28a-DisBa-01.....	61
Figura 5. Géis de SDS-PAGE mostrando etapas da expressão e purificação de DisBa-01.....	62
Figura 6. Solução de fosfatidilcolina de soja e polissorbato 80 em tampão fosfatado salino contendo a desintegrina recombinante DisBa-01.....	64
Figura 7. Curvas de SAXS.....	68
Figura 8. Espectroscopia de fluorescência.....	68
Figura 9. Espectroscopia de dicroísmo circular.....	68
Figura 10. Citotoxicidade celular após exposição aos compostos.....	71
Figura 11. Inibição da adesão celular frente a DisBa-01 livre ou incorporada em micelas.....	75
Figura 12. Inibição da adesão celular frente a anticorpo anti-CD51/61.....	76
Figura 13. Descolamento celular em linhagens expostas à desintegrina recombinante DisBa-01.....	78
Figura 14. Descolamento celular frente a anticorpo anti-CD51/61.....	79

Figura 15. Viabilidade celular em células aderentes ou não expostas a DisBa-01.	82
Figura 16. Detecção de fosfatidilserina externalizada na membrana plasmática por anexina V.....	85
Figura 17. Detecção de terminações 3'-OH livres por reagente Apo-Direct.....	86
Figura 18. Produção de mediadores celulares após adesão.....	89
Figura 19. Produção de VEGF-A após exposição a desintegrina recombinante DisBa-01 livre ou incorporada em micelas.....	92
Figura 20. Produção de IL-8 após exposição a desintegrina recombinante DisBa-01 livre ou incorporada em micelas.....	92
Figura 21. Produção de TGF- β após exposição a desintegrina recombinante DisBa-01 livre ou incorporada em micelas.....	97
Figura 22. Produção de TNF- α após exposição a desintegrina recombinante DisBa-01 livre ou incorporada em micelas.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha 5\beta 1$ = Integrina que se liga à fibronectina, entre outros componentes

$\alpha \text{IIb}\beta 3$ = Integrina plaquetária, que leva à adesão célula-célula

$\alpha \nu \beta 3$ = Integrina que liga à vitronectina, entre outros componentes

λ = comprimento de onda

μg = microgramas

μL = microlitros

μm = micrômetros

Θ = elipticidade

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

$\text{\AA}^{-1}$ = Angstroms invertidos

ATCC = “American Type Culture Collection”, vendedora de material biológico

BSA = soroalbumina bovina

CD51/CD61 = o mesmo que integrina $\alpha \nu \beta 3$

cm = centímetros

CMC = concentração micelar crítica

CO_2 = gás carbônico

DisBa-01 = desintegrina recombinante

DNA = ácido desoxirribonucléico

ELISA = ensaio imunoenzimático

FITC = isotiocianato de fluoresceína

HUVEC = linhagem de endotélio vascular umbilical humano

$I(q)$ = intensidade de espalhamento de radiação em função do vetor q

$\text{IgG1}\kappa$ = anticorpo inespecífico de isotipo $\text{IgG1}\kappa$

IL = interleucina

IL-8 = interleucina 8, também denominada quimiocina CXCL8

IL-10 = interleucina 10

IL-12 = interleucina 12

IPTG = isopropila β -D-1-tiogalactopiranosídeo

K562 = células neoplásicas de origem de linfoblastos indiferenciados

kDa = quilodaltons

LPS = lipopolissacarídeo bacteriano

M = molar

M-C = micela controle

M-DB = micela contendo a desintegrina DisBa-01

mg = miligramas

mL = mililitros

m° = miligraus

mRNA = ácido ribonucléico mensageiro

MTT = brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

mV = milivots

N = normal

ng = nanogramas

nm = nanômetros

PBS = tampão fosfatado salino

pH = potencial hidrogeniônico

PMA = acetato miristato de forbol

q = vetor de espalhamento de radiação

RGD = motivo composto por arginina-glicina-aspartato

SAXS = espalhamento de raios X a baixo ângulo

SC = linhagem normal imortalizada de monócitos/macrófagos humanos

SDS-PAGE = gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TGF- β = fator de crescimento transformante beta

TNF- α = fator de necrose tumoral alfa

u.a. = unidades arbitrárias

V = volts

v/v = volume/volume

VEGF = fator de crescimento endotelial vascular

xg = força centrífuga relativa à gravidade

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Integrinas

Integrinas são proteínas localizadas na membrana celular relacionadas ao controle da adesão celular. Sua face extracelular atua como um receptor e a sua cauda citoplasmática pode interagir com o citoesqueleto e com o maquinário intracelular (AVRAAMIDES et al., 2008). Estas proteínas heterodiméricas são constituídas de uma subunidade α e uma β . Até o momento, são conhecidas 18 subunidades α e 8 β que perfazem um total de 24 integrinas diferentes em mamíferos (Figura 1) (MARGADANT et al., 2011).

Algumas subunidades α e β podem sofrer algumas formas de modificação molecular, como *splicing* alternativo ou modificações proteolíticas pós-transcricionais, resultando em uma grande quantidade de variantes, principalmente em sua cauda citoplasmática, alterando sua afinidade para vias intracelulares e, portanto, suas funções principais. O repertório de integrinas que uma célula apresenta depende da composição da matriz extracelular e do tecido onde se encontra (VACHON, 2011). Não obstante, muitas das integrinas podem adotar uma conformação de baixa, média ou alta afinidade em relação ao seu ligante ideal, e estas conformações coexistem em equilíbrio dinâmico, modificando a forma e a frequência com que se ativam (MARGADANT et al., 2011).

As integrinas podem ser subdivididas em 3 grupos teóricos: (1) as que fazem adesão célula-célula; (2) as vasculares, que se ligam a mediadores solúveis; e (3) as que se ligam principalmente à matriz extracelular. Cada integrina possui seus ligantes ideais, mas suas afinidades podem ser sobrepostas (MARGADANT et al., 2011). Como diversos componentes da matriz podem se ligar a mais de uma integrina, e como o repertório de integrinas em cada célula é grande e diferenciado, as respostas celulares

provocadas pela ligação da célula à matriz extracelular também são variadas (VACHON, 2011).

A maioria das células do organismo humano requer adesão a componentes da matriz extracelular através das integrinas para sobreviver. A morte gerada por perda de adesão, denominada *anoikis*, é um mecanismo de controle evolutivo, finamente regulado, fundamental à manutenção da organização e estrutura do corpo (BUCHHEIT et al., 2012).

Devido a já citada diferença no repertório de integrinas celulares e a sua necessidade de ligação para sobrevivência, os tipos de integrinas presentes em um dado momento em uma célula se tornam os guias para o tecido aonde a célula normal irá se aderir ou para o qual irá migrar (KIM et al., 2012). Entretanto, células tumorais são uma exceção a esta regra. Elas apresentam com frequência resistência à *anoikis* e outras apoptoses (OKAYAMA, 2012), e esta resistência é pré-requisito para a formação de metástases (TADDEI et al., 2011).

1.2. A integrina $\alpha v \beta 3$

Sete diferentes integrinas conhecidas até o momento reconhecem o motivo arginina-glicina-aspartato (RGD), presente em diversas proteínas da matriz extracelular, como fibronectina e vitronectina, apesar de as regiões flanqueadoras do peptídeo também influenciarem nesta ligação (KONSTANTOPOULOS & THOMAS, 2009).

A integrina $\alpha v \beta 3$ (CD51/CD61) pode se ligar a diversos compostos ao reconhecer o motivo RGD, mas se liga com maior avidéz à vitronectina. Esta integrina é expressa em vasos sanguíneos de diversos tumores humanos e em regiões de ampla inflamação, mas está em níveis muito reduzidos ou mesmo ausente nos tecidos humanos

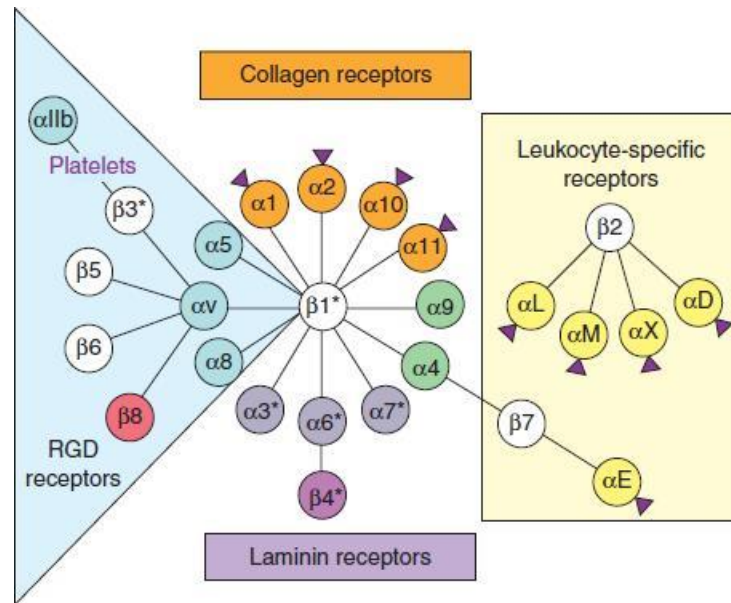


Figura 1. As diferentes integrinas e seus principais ligantes. Cada integrina é composta de uma subunidade α e uma β , e possuem afinidades a diferentes compostos, com diferentes intensidades. O principal ligante de cada integrina está demonstrado. “Collagen receptors”: receptores para colágeno; “leukocyte-specific receptors”: receptores específicos de leucócitos; “laminin receptors”: receptores para laminina; “RGD receptors”: receptores RGD; “platelets”: plaquetas. Fonte: Hynes & Naba, 2012.

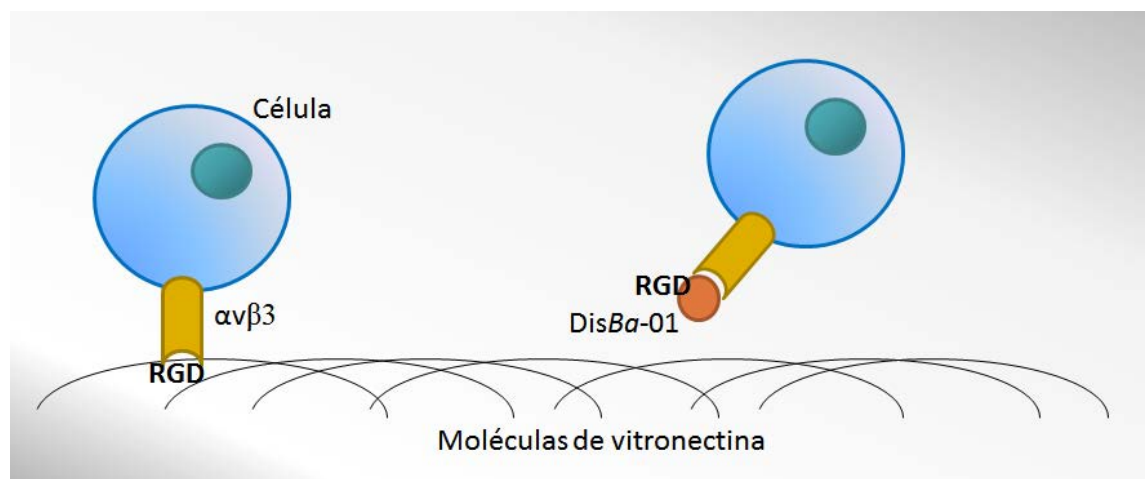


Figura 2. Atuação da desintegrina recombinante DisBa-01. Células que possuem a integrina $\alpha v \beta 3$ se ligam ao motivo arginina-glicina-aspartato (RGD) em componentes que o possuem, como a vitronectina. Alternativamente, a integrina $\alpha v \beta 3$ pode se ligar ao RGD de DisBa-01 e, nesta condição, não se ligará a vitronectina.

adultos normais (AVRAAMIDES et al., 2008; KONSTANTOPOULOS & THOMAS, 2009).

Células derivadas da medula óssea, como o monócito/macrófago, também expressam esta integrina, apesar de ser em quantidades um pouco reduzidas, e ela é uma das responsáveis pela passagem destas células ao sangue e por sua migração para ambientes neovasculares (DESGROSELLIER & CHERESH, 2010). Além das suas funções típicas de integrina de gerar adesão e migração, a integrina $\alpha v \beta 3$ parece estar relacionada ao controle do crescimento celular, sobrevivência e migração durante a angiogênese (KONSTANTOPOULOS & THOMAS, 2009).

1.3. O câncer e seus tipos celulares

As diversas doenças caracterizadas por mutação genômica e proliferação exacerbada são coletivamente denominadas de câncer. Há projeção de ocorrência de 518.510 casos novos de câncer para os anos de 2012 e similar para 2013, no Brasil. Esta é a segunda causa principal de morte entre os brasileiros, atrás apenas das doenças cardiovasculares, mas à frente das causas externas (INCA, 2011). O câncer é um tecido complexo, composto de múltiplos tipos celulares que interagem entre si e influenciam na progressão tumoral. Muitas das células envolvidas nesta interação são células normais do hospedeiro que estavam no sítio de surgimento do tumor ou que foram atraídas para tal região (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

Em um microambiente tumoral, a resposta imune elimina células malignas que possam ser reconhecidas como “estranhas” e que sejam sensíveis aos mecanismos imunológicos. E por isso mesmo, o sistema imune acaba selecionando as células tumorais mais aptas a sobreviverem nesse ambiente hostil. E não apenas isso, os

mediadores imunológicos e de cicatrização liberados neste ambiente lesionado acabam por estimular o crescimento tumoral (CROCI et al., 2007).

A angiogênese associada ao câncer, ou seja, a formação de uma nova rede vascular, se ativa durante os estágios pré-neoplásicos do desenvolvimento tumoral e é regulada positiva ou negativamente por células tumorais, endoteliais, estromais e leucócitos. Dentre outros fatores, as células tumorais produzem mediadores capazes de atrair os macrófagos, o que ocorre de forma mais intensa em estado de hipóxia. Os macrófagos são capazes de produzir fatores pró-angiogênicos, como as interleucinas, fatores de crescimento, mediadores lipídicos e prostaglandinas, mas também são capazes de gerar moléculas antiangiogênicas, que danificam a integridade dos capilares. Entretanto, as funções pró-angiogênicas tendem a ser mais importantes. Os macrófagos do hospedeiro são considerados como células infiltrantes fundamentais ao desenvolvimento da angiogênese, por produzirem interleucinas e mediadores atuantes neste cenário (HAO et al., 2012).

1.4. Mediadores solúveis e o câncer

As interleucinas (IL) são moléculas solúveis pequenas, capazes de gerar sinais celulares, organizando a comunicação e interação entre células imunes e outros tipos celulares (YUZHALLIN & KUTIKHIN, 2012). Elas podem apresentar funções paradoxais no câncer, de acordo com o local de sua produção e sua concentração.

A IL-8, também chamada de quimiocina CXCL8, é uma citocina com funções pró-angiogênicas importantes, sendo produzida principalmente por células imunes associadas ao tumor e por algumas células neoplásicas e endoteliais. Usualmente, sua produção no microambiente tumoral leva a um aumento da inflamação, com

recrutamento de células imunes e à progressão do tumor e à metástase (YANG et al., 2011; DAHNIER et al., 2012).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é amplamente produzido em uma gama de tumores humanos, com funções predominantemente angiogênicas, capazes de serem produzidas pelas células imunes e pelas próprias células tumorais e endoteliais do microambiente tumoral (CULIG, 2011). Níveis elevados deste mediador podem ser fortemente associados à imunossupressão local, à progressão tumoral, angiogênese e formação de metástases (SITOHY et al., 2012).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é produzido por células da imunidade inata e células tumorais, e possui atividade antitumoral contra uma variedade de linhagens tumorais, mas paradoxalmente esta citocina pode aumentar a capacidade de invasão da célula tumoral e pode estar relacionada com a tumorigênese (GERMANO et al., 2008). A produção constitutiva de TNF- α no microambiente tumoral é encontrada em diversos tipos de câncer e sua produção deriva das células tumorais e de células associadas, como as endoteliais, fibroblastos e células imunes infiltradas, estando associada a um prognóstico pior (HAO et al., 2012).

O fator de crescimento transformante beta (TGF- β) é um regulador do crescimento celular, apoptose, diferenciação e migração. É capaz de inibir a proliferação de diversos tipos celulares, como células epiteliais, endoteliais, linfócitos e inclusive células tumorais, e de estimular a apoptose. Mas também pode aumentar a capacidade de sobrevivência independente de adesão, sendo relacionado à resistência a *anoikis*, e facilitando a invasão e a metástase. Não obstante, também é capaz de estimular a deposição de matriz extracelular, perturbando a resposta inflamatória e estimulando a angiogênese (BUCHHEIT et al., 2012; MIYAZONO et al., 2012).

Os macrófagos do hospedeiro produzem ainda citocinas que poderiam levar a uma ativação imune efetiva contra o tumor, como a IL-12, que estimula a imunidade inata e adaptativa, levando a uma resposta imune celular e à eliminação tumoral. Apresenta ainda funções antiangiogênicas e é capaz de levar à regressão de tumores já estabelecidos (HAO et al., 2012; YUZHALLIN & KUTIKHIN, 2012).

Sendo produzida por macrófagos e linfócitos, a IL-10 apresenta funções anti-inflamatórias e imunossupressoras e de reparo tecidual (HAO et al., 2012). Esta citocina é capaz de reduzir a produção de mediadores como IL-8 e TNF- α , que em determinados tumores são cruciais para o desenvolvimento do câncer, e pode também estimular a apoptose e suprimir a angiogênese (NAUNDORF et al., 2009; CULIG, 2011). Entretanto, a imunossupressão gerada pode estimular indiretamente o crescimento tumoral. Clinicamente, esta citocina está em maiores concentrações em neoplasias mais avançadas (GERMANO et al., 2008).

1.5. Integrinas em tumores malignos

Em relação às integrinas, estas se localizam tanto nas células do hospedeiro quanto nas tumorais, e o repertório celular de integrinas tende a se modificar quando há a transformação tumoral: algumas integrinas passam a ser hiper-expressas, enquanto outras têm seus níveis bastante reduzidos (KIM et al., 2012).

Em níveis moleculares, as integrinas situam-se 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 proteínas transmembranas, através de moléculas adaptadoras citoplasmáticas, tanto nas células tumorais quanto nas células inflamatórias associadas ao tumor. Esta relação modifica as funções principais de ambos os receptores, exacerbando algumas destas propriedades. Consequentemente, a

progressão tumoral e invasão dependem fundamentalmente desta relação molecular (CROCI et al., 2007; DESGROSELLIER & CHERESH, 2010).

Esta relação molecular ocorre, por exemplo, com a integrina $\alpha\beta3$ e o receptor de tipo 2 de VEGF. Após a aproximação, as caudas citoplasmáticas de ambos os receptores ativos interagem, e a sinalização intracelular desencadeada é mais intensa do que se cada receptor tivesse se ativado independentemente. Há ainda a modificação de função que ocorre após a interação entre integrinas e receptores de fatores de crescimento, por exemplo: as integrinas $\beta3$ estimulam a produção de VEGF e produzem mais receptores tanto de VEGF quanto a própria integrina $\beta3$; as integrinas $\beta1$ geram sinais que inibem a adesão celular, facilitando a dispersão da célula; as integrinas $\beta5$ geram sinais que estimulam a adesão celular, estimulando a sobrevivência. Estes mecanismos dependem do repertório de integrina de cada célula, de quais receptores de fatores de crescimento estão sendo mais ativados e quais são os adaptadores intracelulares que auxiliam na interação das caudas citoplasmáticas. Esta relação molecular já foi implicada para diversas integrinas e está clinicamente reconhecida em cânceres de próstata, mama, ovário e gliomas (CHIODONI et al., 2010). Sendo assim, as integrinas presentes nas células tumorais e nas células infiltradas podem modificar amplamente o destino do tumor.

Em relação à integrina $\alpha\beta3$, frente ao câncer ela se torna hiper-expressa em vasos sanguíneos locais, e sua expressão é estimulada por diversos fatores angiogênicos, como TNF- α e IL-8 (DESGROSELLIER & CHERESH, 2010). Ela também se encontra em muitas células tumorais e participa na transformação epitelial-mesenquimal, processo em que a célula tumoral muda gradualmente suas características, adquirindo maior capacidade migratória e de sobrevivência à perda de adesão, sendo um pré-requisito para a formação de metástases (JANIK et al., 2010). Por causa de suas

características, $\alpha v\beta 3$ é considerada um alvo privilegiado em terapias antitumorais (GENTILUCCI et al., 2010).

1.6. Desintegrinas

Os antagonistas das integrinas, em sua maioria anticorpos, podem reduzir a progressão tumoral, e existem ensaios pré-clínicos e clínicos utilizando vários tipos de antagonistas com sucesso (GENTILUCCI et al., 2010; DESGROSELLIER & CHERESH, 2010).

Dentre os possíveis peptídeos antagonistas de integrina encontram-se moléculas derivadas de venenos de serpentes. Venenos de serpente possuem diversas substâncias ativas, como as metaloproteinases. Estas metaloproteinases são enzimas multi-domínios, podendo ser dos tipos: 1) P-I, composta de um peptídeo sinal, um pró-domínio e um domínio metaloproteinase; 2) P-II, contendo uma metaloproteinase e um domínio desintegrina; 3) P-III, contendo um domínio rico em cisteína, uma metaloproteinase e um domínio desintegrina-símile; e 4) P-IV (ou também denominado P-III-B), similar ao P-III, mas acrescido de um domínio lecitina-símile (FOX e SERRANO, 2005).

A proteólise das metaloproteinases do tipo P-II gera pequenos peptídeos solúveis de 40 a 100 aminoácidos, capazes de afetar a adesão celular e inibir a agregação plaquetária: as desintegrinas. Estas moléculas pertencem a uma família de proteínas não enzimáticas, de baixo peso molecular, ricas em cisteína. A maioria das desintegrinas derivadas das metaloproteinases P-II contém sequências RGD, que se antagonizam às integrinas $\alpha IIb\beta 3$ e $\alpha v\beta 3$.

A desintegrina recombinante DisBa-01 (Figura 2) é monomérica e é derivada de uma metaloproteinase de tipo P-II, sendo obtida a partir de ácidos ribonucléicos

mensageiros (mRNAs) extraídos da glândula venenífera de um espécime de *Rhinocerophis alternatus*, popularmente conhecida como urutu-cruzeiro. Esta desintegrina possui massa molecular de 11,637 kDa e 6 pontes dissulfeto, podendo ser produzida de forma heteróloga em bactérias e posteriormente purificada. Esta desintegrina é RGD-dependente, e atua principalmente sobre as integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha IIb\beta 3$, tendo uma maior região de contato com a subunidade $\beta 3$. Um dos seus principais mecanismos de ação é a potente capacidade de inibir a adesão celular de linhagens celulares portando a integrina $\alpha v\beta 3$ à vitronectina, de forma específica (KAUSKOT et al., 2008; RAMOS et al., 2008). Apresenta também uma provável capacidade antimetastática *in vivo* (RAMOS et al., 2008), antitrombótica *in vitro* (KAUSKOT et al., 2008) e parece ser capaz de reduzir a formação de mRNA para os receptores de VEGF 1 e 2 (MONTENEGRO et al., 2012). Assim, a desintegrina DisBa-01 tem se mostrado um importante composto para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento antitumoral.

1.7. Micelas

Uma das grandes dificuldades encontradas no tratamento do câncer é a incrível quantidade de efeitos colaterais. Para evitar este problema, a tendência é pesquisar fármacos mais eficazes e incorporá-las em sistemas de liberação modificados. Os sistemas de liberação podem direcionar o fármaco ao tecido alvo de forma passiva, se acumulando em locais onde a microvasculatura esteja mais permeável, como em tecidos inflamados. Particularmente no caso do câncer, os mediadores que estimulam angiogênese estão em níveis mais elevados, gerando aumento da permeabilidade vascular. Além disto, a arquitetura caótica de vasos sanguíneos melhora a liberação do

fármaco a partir de seu sistema de transporte (MALAM et al., 2009; TRAN et al., 2009).

Para ser eleito um bom sistema de transporte, os materiais que compõem o vetor devem ser biocompatíveis e biodegradáveis ou capazes de serem eliminados do organismo após a liberação do fármaco. Sendo assim, existem dois grupos principais de moléculas com esta finalidade: (1) os compostos de base lipídica, como a fosfatidilcolina; e (2) os polímeros naturais, como proteínas e polissacarídeos, ou sintéticos (BEIJA et al., 2012).

As micelas (Figura 3) são sistemas de transporte considerados bastante dispersos, apresentando uma boa taxa de captação de fármacos e de liberação destes em condições adequadas. Este sistema apresenta baixa instabilidade física em termos de aglomerações e separação da fase dispersa, que possui partículas pequenas, normalmente de até 200 nm. A disponibilidade oral gerada pelas micelas ainda é imprevisível e variável, mas as formulações micelares de uso oral evitam o passo de dissolução dos fármacos. Não obstante, as micelas tendem a ser prontamente formadas após o acréscimo de água aos demais componentes seguido de homogeneização, permitindo às formulações serem comercializadas como prontas para o uso ou ainda como concentrados não aquosos para serem dissolvidos na hora do uso, aumentando o tempo útil de armazenagem e evitando problemas no transporte (NARANG et al., 2007).

Quando há a união entre moléculas surfactantes e lipídeos em uma solução aquosa para haver a formação de micelas, alguns passos ocorrem, podendo decorrer poucos minutos ou até várias horas, dependendo do método utilizado. Durante o primeiro passo, as moléculas de surfactante se distribuem entre os compartimentos lipídico e aquoso, enquanto o compartimento lipídico muitas vezes engloba água

formando bicamadas vesiculares pouco estáveis. Em um segundo passo, vesículas saturadas por surfactante coexistem com fragmentos da bicamada lipídica já entremeada por surfactante, que podem formar gotas, folhas e outros formatos. As chamadas gotas são mais comuns para surfactantes não iônicos. Conforme a dissolução ocorre e se aumenta a razão entre surfactante e lipídeos pelo rompimento gradual das vesículas formadas apenas por surfactante, são formadas as micelas mistas, que são pequenas micelas anfifílicas, cujo tamanho final tende a ser determinado pela quantidade de surfactante em proporção aos lipídeos, e que são mantidos unidos por forças físicas (SIMÕES et al., 2005).

A fosfatidilcolina está entre os fosfolípidos mais abundantes em animais e plantas e é parte fundamental para a construção da membrana celular, compreendendo parte do feixe externo da membrana plasmática. É também o principal fosfolípido circulante no plasma humano, onde integra as lipopoliproteínas, especialmente a fração de alta densidade. A fosfatidilcolina altera o metabolismo de colesterol e triglicerídeos e modifica a composição dos depósitos gordurosos, sendo, por isso, utilizada em tratamentos cosméticos de forma considerada efetiva e segura (MYERS, 2006). Também pode ser usada como conservante na indústria (PHUTIKANIT et al., 2011). Não obstante, é usada em sistemas micelares diversos e é particularmente útil para aumentar a absorção pela pele, tornando as micelas mais flexíveis, que podem passar pelos poros dérmicos mais facilmente (SPERNATH et al., 2008).

Os polissorbatos são provavelmente o tipo de surfactante não iônico mais utilizado na indústria farmacêutica, ainda que sua produção gere compostos um tanto heterogêneos (SIMÕES et al., 2005).

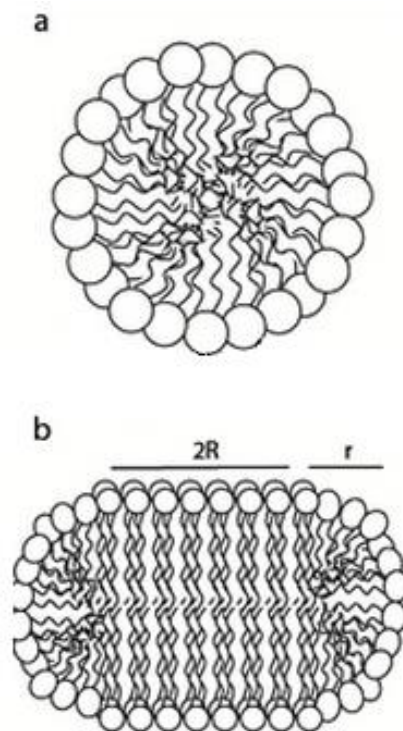
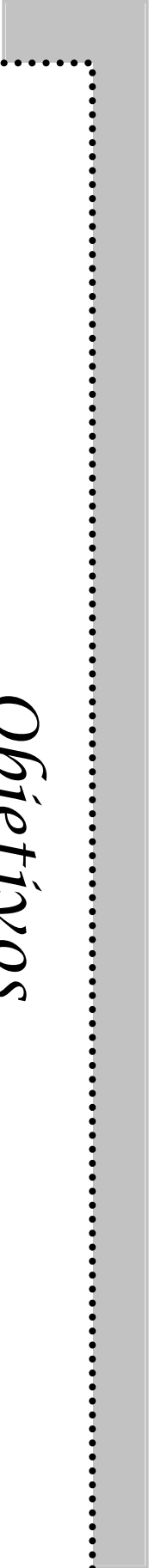


Figura 3. Diferenças entre micelas contendo ou não lipídeos. (a) Micela contendo apenas surfactante; ou (b) contendo surfactante e lipídeos. Neste caso, os lipídeos tendem a se acumular mais na região mais circular e o surfactante tende a se localizar mais na região mais achatada. Fonte: Måler & Gräslund, 2009.

Segundo a Farmacopeia Brasileira, o polissorbato 80 é um líquido claro, amarelado, composto de uma mistura de oleatos do sorbitol e seus anidridos copolimerizados com aproximadamente 20 mols de óxido de etileno para cada mol de sorbitol e seus anidridos, capaz de atuar como tensoativo (ANVISA, 2010).

Este composto já foi estudado quanto aos seus possíveis efeitos tóxicos, apresentando uma ampla margem de segurança, já conhecida desde 1984 (revisto por SIMÕES et al., 2005), e foi observado que mesmo durante a fase de crescimento, a partir do primeiro dia de vida, em um modelo de galinhas, ele não apresenta características hepatotóxicas ou nefrotóxicas, mesmo que venha a ser utilizado em níveis altos e de forma crônica (KHOSRAVINIA et al., 2011). Este composto auxilia no encaminhamento de partículas para o cérebro (SUN et al., 2004) e pode prevenir instabilidades protéicas quando em sistema, em curto prazo e mantida a temperatura ideal (WANG et al., 2008). Na indústria, ele auxilia na solubilização, estabilização, modificação microcristalina, melhora da absorção oral e dérmica, e extração de fármacos, além de ser frequentemente utilizado como aditivo alimentar (SIMÕES et al., 2005).

Mediante o exposto, supõe-se que a atuação da desintegrina DisBa-01 em células que possuam a integrina $\alpha\beta3$ poderia elucidar seu papel enquanto composto antitumoral, provendo caminhos para futuros estudos e possivelmente futuras terapias.



Objetivos

2. OBJETIVOS

Observar a atuação da desintegrina recombinante DisBa-01 livre ou em formulação incorporada em micelas nas propriedades adesivas de células contendo ou não a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$, bem como a produção de fatores solúveis por estas.

Pretendeu-se especificamente:

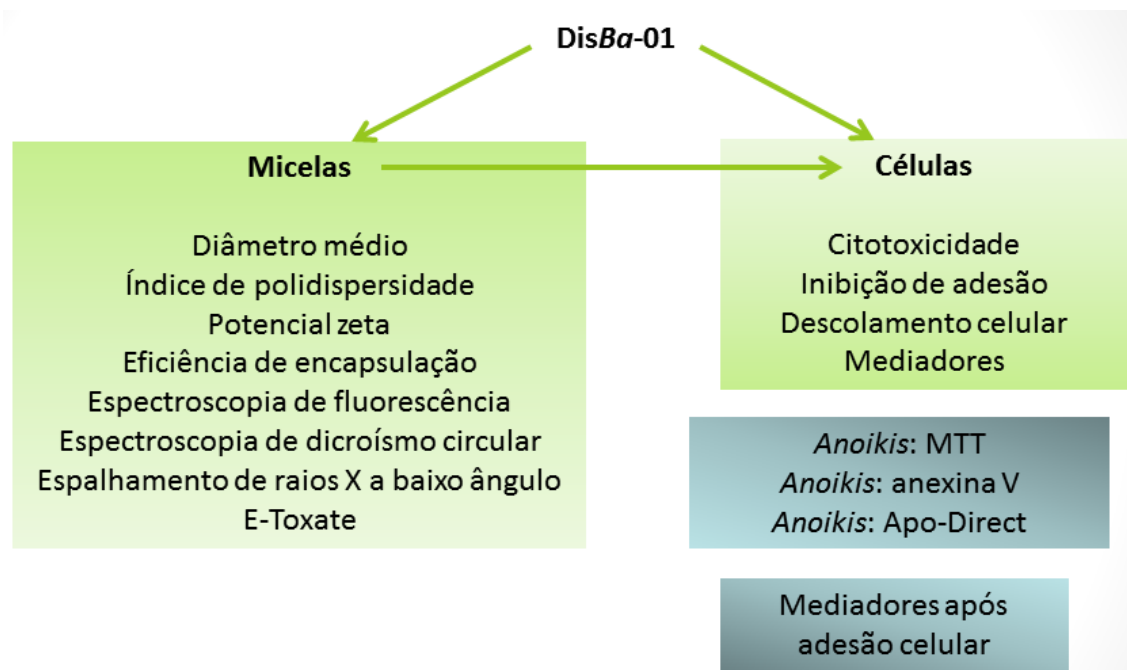
- obter a desintegrina DisBa-01;
- preparar micelas contendo ou não a desintegrina e caracterizá-las quanto aos seus aspectos físicos e a encapsulação da desintegrina recombinante e sua conformação;
- verificar a atuação das micelas e da desintegrina livre frente às células que possuam ou não a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ quanto às propriedades adesivas, *anoikis* e a liberação de mediadores.



Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental



A desintegrina foi obtida a partir de diálises e cromatografias, e então foi incorporada em micelas (M-DB) e, à parte, foram feitas micelas sem a desintegrina (M-C). As micelas foram caracterizadas quanto suas propriedades físicas: diâmetro médio, índice de polidispersidade, cargas superficiais (potencial zeta) e espalhamento de raios X a baixo ângulo. A desintegrina incorporada foi analisada quanto à eficiência de encapsulação e sua conformação (espectroscopias). Tanto a desintegrina livre quanto micelar foram observadas quanto à presença de endotoxinas (E-Toxate).

As células foram expostas à desintegrina livre ou incorporada em micelas para se observar a citotoxicidade, alteração na adesão frente a vitronectina ou fibronectina (inibição de adesão e descolamento celular) e a produção de mediadores diversos. A desintegrina livre também foi colocada em cultura celular para se observar a *anoikis*. Em testes isolados, as células foram colocadas frente aos componentes da matriz

extracelular vitronectina e fibronectina para se observar se a adesão a estes componentes gerava por si só a produção de mediadores.

3.2. Obtenção da desintegrina recombinante DisBa-01

3.2.1. Expressão da desintegrina

A proteína recombinante DisBa-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). Originalmente, a desintegrina foi obtida a partir de ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNAs) extraídos da glândula de veneno da serpente *Rhinocerothis alternatus*, a partir dos quais foi feita uma biblioteca de ácidos desoxirribonucleicos complementares (cDNA). O produto correspondente à DisBa-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-tiogalactopiranosídeo) 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 xg e 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso 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 de duração de 1 minuto cada e intervalo de 30 segundos, amplitude de 20 hertz. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 9000 xg, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (S1) foi armazenado a -20°C para realização posterior de um gel de poliacrilamida SDS-PAGE, conforme descrito no Item 3.2.3, e o precipitado foi suspenso 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 9000 xg, 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 DisBa-01.

3.2.2. Purificação e concentração da desintegrina recombinante 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 foram eluídas através de um gradiente de Imidazol (Imidazol 1 M, NaCl 0,5 M, HCl 160 mM, pH 7,9) e foram dialisadas utilizando membrana para exclusão de peso molecular de 3,5 (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 tampões de equilíbrio e eluição (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. A concentração da proteína foi estimada através do teste BCATM Protein Assay Kit (Pierce Protein Research Products).

3.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

As frações cromatográficas eluídas 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 1:1 (v/v), 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. Tais alíquotas foram então aquecidas a 100°C por 15 minutos. Então, 10 μ L de cada amostra foram aplicados 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 adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich). As bandas protéicas foram detectadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich).

3.3. Preparo das micelas

As micelas foram preparadas no Laboratório de Farmacotécnica, do Departamento de Fármacos e Medicamentos, FCFAR, UNESP. As micelas foram preparadas em tampão fosfatado salino (PBS pH 7,2) acrescido de fosfatidilcolina de soja (Epikuron) a 3,50% e de polissorbato 80 (Tween 80) a 1,50%, contendo ou não a desintegrina DisBa-01 em concentração final de 10 μ M. As micelas contendo a desintegrina foram nomeadas de M-DB, e as micelas controle de M-C. A mistura assim preparada foi bem homogeneizada e a seguir foi submetida à sonicação com 20% de

amplitude, sob refrigeração em banho de gelo, com pulso de 1 min e intervalo de 1 min, por um total de 10 pulsos, para obtenção das vesículas. As micelas assim obtidas foram então separadas da proteína não encapsulada através de uma exclusão de peso molecular, utilizando-se Amicon Ultra 0.5 30 kDa (Millipore), conforme instruções do fabricante. Após a exclusão, as micelas foram filtradas para esterilizar a 0,22 μ m (Millipore) e foram armazenadas a 4°C até o momento do uso, ou por no máximo 1 semana. No momento do uso, as micelas foram diluídas à concentração de 20 ou 10 mg de lipídeos por mL, baseado na concentração de fosfatidilcolina de soja.

3.4. Caracterização das micelas

3.4.1. Determinação do diâmetro médio e distribuição granulométrica

As preparações foram diluídas em água Milli-Q na proporção de 1:20 (v/v). Todas as amostras foram mantidas em temperatura ambiente no momento da análise e foram utilizadas cubetas de vidro. O diâmetro médio e o índice de polidispersidade foram observados sob fonte de laser vermelho ($\lambda = 633$ nm) no equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments), do Laboratório de Materiais Magnéticos e Colóides, do Instituto de Química – UNESP, Araraquara. Posteriormente, os dados foram avaliados utilizando o software DTS Zetasizer 6.20 para Windows (Malvern Instruments). O índice de refração da água purificada foi considerado o padrão. Foram realizadas três análises para cada tipo de preparação, com 10 determinações para cada uma delas. Os resultados são expressos como valores médios e desvio padrão de nm para o diâmetro médio, e como valores médios e desvio padrão em unidades arbitrárias para o índice de polidispersidade.

3.4.2. Determinação do potencial zeta

As preparações foram diluídas em água Milli-Q na proporção de 1:20 (v/v). Todas as amostras foram mantidas em temperatura ambiente no momento da análise e foram utilizadas cubetas próprias para esta técnica. O potencial zeta foi observado no equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments), do Laboratório de Materiais Magnéticos e Colóides, do Instituto de Química – UNESP, Araraquara. Para converter a mobilidade eletroforética em valores de potencial zeta foi utilizado o software DTS Zetasizer 6.20 para Windows (Malvern Instruments). A carga elétrica do solvente foi considerada como a da água Milli-Q. Foram realizadas três análises para cada tipo de preparação, com 10 determinações para cada uma delas. Os resultados foram apresentados como valores médios e desvio padrão de mV.

3.4.3. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A análise de SAXS (do inglês “Small-angle X-ray scattering”) para as micelas foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, SP), sob supervisão da Profa. Leila Aparecida Chiavacci. A linha do aparelho é equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda (λ) de 1,488 Å, uma câmara de ionização, um detector vertical localizado a 1496,807 mm da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento, $I(q)$, calculada como uma função do vetor de espalhamento q . Os dados foram normalizados para eliminar interferências, como o decaimento natural da intensidade da fonte do síncrotron, a sensibilidade do detector e a transmissão da amostra. Da intensidade total de espalhamento foi subtraída aquela produzida pelo substrato e pelo ar. O resultado representa $I(q)$ em unidades arbitrárias em função do vetor q em Å⁻¹.

3.5. Eficiência de encapsulação

3.5.1. Separação de proteínas contidas no solvente da suspensão de micelas

Para a separação da proteína não encapsulada nas micelas foi realizada uma exclusão por peso molecular utilizando Amicon Ultra 0.5 30 kDa (Millipore), conforme instruções do fabricante. A proteína assim obtida foi precipitada através da técnica aqui nomeada como DOC-TCA-Acetona. Rapidamente, a cada amostra foi acrescentado 1% (v/v) de uma solução de desoxicolato de sódio (DOC) 2% em água e as amostras foram incubadas a 4°C por 30 minutos. A seguir, para cada 1 mL de amostra, foi acrescentado 150 µL de ácido tricloroacético (TCA) 100% e a solução foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos, seguida de uma incubação de 18 horas a 4°C. Então, a solução foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 15000 xg. O sobrenadante foi retirado por inversão em papel absorvente. A seguir, foi acrescentado 1 mL de acetona gelada (mantida a -20°C), homogeneizado e incubado em gelo por 10 minutos. A acetona foi removida por centrifugação a 4°C 15000 xg durante 10 minutos. Foi feita uma nova adição de acetona e centrifugação, exatamente como no passo anterior. Após, o sobrenadante foi removido por inversão sobre papel absorvente e as proteínas foram suspensas em 0,1 mL de uma solução de NaOH 0,1 M para realização da dosagem protéica.

3.5.2. Dosagem protéica

A dosagem de proteínas não encapsuladas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), modificado por Fryer et al. (1986). 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 Na₂CO₃ 2% em NaOH 0,1 N; 1 mL de CuSO₄.5H₂O 1%; 1 mL de Tartarato de Na e K 2%). Foi feita uma incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentado 20 µL do reagente de

Folin 1 N (Imbralab) e homogeneizado rapidamente. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro em filtro de 620 nm. Um branco contendo apenas NaOH 0,2 M foi submetido a todos os passos citados. Uma curva de concentrações conhecidas de DisBa-01 foi utilizada como padrão. Os resultados foram expressos em ng/mL de proteína.

3.6. Caracterização estrutural da desintegrina incorporada em micelas

3.6.1. Espectroscopia de fluorescência

A análise foi realizada em espectrofluorímetro no Laboratório de Biofísica Molecular, USP, São Carlos (IFSC), com o acompanhamento da Profª. Ana Paula Ulián de Araújo. As amostras micelares foram previamente diluídas 1:100 (v/v) em água milli-Q. A água Milli-Q foi considerada como o branco da reação.

3.6.2. Espectroscopia de dicroísmo circular

A análise foi realizada no Laboratório de Biofísica Molecular, USP, São Carlos (IFSC), com o acompanhamento da Profª. Ana Paula Ulián de Araújo. As amostras foram diluídas 1:25 ou 1:50 (v/v) em água milli-Q. Os espectros de dicroísmo circular das formulações foram obtidos na faixa de 190 a 250 nm em espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco UK), com 8 medidas por amostra, utilizando cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico. A água Milli-Q foi considerada como branco. Posteriormente, os espectros de dicroísmo circular foram analisados utilizando-se o software Spectra Manager para Windows (Jasco UK).

3.7. Teste qualitativo para endotoxinas

A observação de endotoxinas nas amostras de proteína livre ou incorporada em micelas foi realizada através do teste E-toxate (Sigma-Aldrich), de acordo com instruções do fabricante. Rapidamente, 100 μ L de cada um dos compostos ou dos controles foram incubados com 100 μ L do reagente E-toxate a 37°C por 1 hora. Foram utilizados os controles positivos: lipopolissacarídeo de parede de *Escherichia coli* (LPS, Sigma-Aldrich) a 10 μ g/mL e a 1 μ g/mL; e os controles negativos: água milli-Q e soro fetal bovino comercial livre de endotoxinas (Sigma-Aldrich). Após 1 hora, os tubos foram vertidos lentamente a 180°, para se observar a consistência do gel formado. Segundo o fabricante, um gel firme, que não se desfaz ao virar o tubo, é considerado um teste positivo; qualquer outro resultado (géis fracos, turbidez, aumento de viscosidade ou líquido) é considerado um teste negativo.

As amostras de desintegrina recombinante DisBa-01 livre e incorporada em micelas, bem como a micela controle, não apresentaram características de presença de endotoxinas e, portanto, puderam ser utilizadas ao longo do estudo.

3.8. Linhagens celulares

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

- 1) HUVEC (ATCC CRL-2873), linhagem de endotélio vascular humano, capaz de expressar $\alpha v\beta 3$ (TEKLEMARIAM et al., 2011);
- 2) SC (ATCC CRL-9855), linhagem normal imortalizada de monócitos/macrófagos humanos (YAMAMOTO et al., 2007), foi adquirida diretamente da ATCC;
- 3) K562 (ATCC CCL-243), células neoplásicas, linfoblastos indiferenciados; esta linhagem apresenta predominantemente integrina $\alpha 5\beta 1$, e não expressa $\alpha v\beta 3$ ou $\alpha IIb\beta 3$

(GENTILUCCI et al., 2010), foi gentilmente cedida pela Profa. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.

As linhagens celulares foram mantidas em garrafas contendo meio de cultura adequado, de acordo com as necessidades nutricionais de cada uma (meios de cultura, acrescidos de aminoácidos ou outros fatores), suplementado com soro fetal bovino inativado (todos os itens foram adquiridos da Sigma-Aldrich) conforme necessário, e mantidas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂. A manutenção das células foi realizada conforme indicada pela ATCC. Os repiques foram feitos de 1 a 3 vezes por semana, conforme as características de cada linhagem. As células utilizadas nos experimentos eram obtidas sempre entre os repiques 10 e 20 de cada descongelamento.

3.9. Preparo das placas de cultura sensibilizadas

As placas foram sensibilizadas conforme descrito pelo fabricante da fibronectina e vitronectina (Sigma-Aldrich). Rapidamente, placas de cultura estéreis de 96 cavidades de fundo plano foram sensibilizadas com 80 µL de vitronectina a uma concentração de 0,5 µg/mL em água milli-Q, por 2 horas a 37°C. As placas foram então armazenadas a 4°C até o momento do uso. À parte, placas de cultura estéreis de 96 cavidades de fundo plano foram sensibilizadas com 80 µL de fibronectina (5 µg/mL) diluída em tampão fosfatado salino pH 7,4 por 18 horas a 4°C. As placas foram então armazenadas a 4°C até o momento do uso. Em todos os ensaios que utilizou placas sensibilizadas, uma placa controle foi utilizada, preparada através da incubação com soroalbumina bovina (BSA) 2% em PBS, por 1 hora a 37°C e armazenada a 4°C.

No momento do uso, o líquido do interior de cada placa foi descartado por inversão e as placas foram bloqueadas com 200 µL de uma solução de BSA a 1%, diluída em tampão de adesão (constituído de KCl 5 mM, NaCl 150 mM, Hepes 20 mM,

MgCl₂ 5mM, MnCl₂ 1 mM, pH 7,4) por pelo menos 1 hora a temperatura ambiente. Imediatamente antes do uso, a solução de bloqueio foi descartada e as placas foram lavadas com 200 µL de tampão de adesão. As placas de cultura sensibilizadas com vitronectina foram utilizadas para os ensaios com as linhagens HUVEC e SC, enquanto as placas sensibilizadas com fibronectina foram utilizadas para os ensaios com as linhagens K562 e SC.

3.10. Ensaio de citotoxicidade

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) (MOSMANN, 1983). A concentração celular e o delineamento principal do ensaio foram padronizados para cada linhagem seguindo os princípios de Freshney (2005). Às placas de cultura estéreis de 96 cavidade de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 µL por cavidade das suspensões das linhagens celulares SC e K562, ajustadas à concentração de 5×10^5 células/mL no meio de cultura preferencial de cada uma, em presença de 100 µL de DisBa-01 livre a 10 ou 5 µM, micelas vazias (M-C) ou contendo a desintegrina (M-DB) a 20 ou 10 mg de lipídeos/mL, lipopolissacarídeo obtido de *Escherichia coli* (LPS, Sigma-Aldrich) a 10 e 5 µg/mL e acetato miristato de forbol (PMA, Sigma-Aldrich) a 20 e 5 ng/mL, ou apenas tampão (controle negativo), em duplicata. Para a linhagem HUVEC, foram adicionados 200 µL de células a uma concentração de 5×10^4 células/mL no meio de cultura preferencial, e a placa foi incubada *overnight* a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA), para a ocorrência da adesão celular. O sobrenadante da placa de cultura de HUVEC foi descartado, e então foram adicionados 100 µL do meio de cultura e mais 100 µL de cada um dos compostos, como realizado para as outras linhagens.

As placas de todas as linhagens foram incubadas por 24 horas ou 48 horas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Após este período, as células foram expostas a uma solução de MTT a 1 mg/mL e incubadas a 37°C por 3 horas para a linhagem HUVEC e 4 horas para K562 ou SC. Após esta incubação, o meio de cultura foi descartado e os cristais de formazana foram solubilizados com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt). 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.

3.11. Ensaio de inibição da adesão celular

A metodologia foi proposta por Löster & Horstkorte (2000) e a quantificação foi realizada por cristal violeta. Em tubos de ensaio foram adicionadas células HUVEC, SC ou K562, ajustadas à concentração de 5×10^5 células/mL no meio de cultura preferencial de cada uma, e foi adicionado igual volume dos compostos diluídos em tampão de adesão: DisBa-01 livre ou incorporada em micelas ou apenas tampão de adesão como controle. As células HUVEC e SC também foram expostas em ensaio a parte ao anticorpo comercial anti-CD51/CD61, que se liga à integrina $\alpha\beta_3$, ou ainda isotipos controles IgG1 κ . As soluções assim formadas foram incubadas por 30 min a 4°C. Então, 100 µL de cada solução foram transferidos às placas sensibilizadas (Item 3.9), e as placas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 410 xg por 2 min a 4°C para aproximar as células do fundo da placa. Tais placas foram então incubadas a 37°C por 1:30 hora. Após este período, as placas foram lavadas com 200 µL de tampão de adesão para retirar todas as células não aderidas. A seguir, foi realizada uma quantificação por cristal violeta, como descrito no Item 3.13. Os resultados foram expressos em

quantidade de células por mililitro, calculados com base em uma curva contendo concentrações conhecidas de células.

3.12. Ensaio de descolamento celular

A metodologia é proposta por Löster & Horstkorte (2000) e a quantificação foi realizada por cristal violeta. Em placas sensibilizadas (item 3.9) foram adicionados 100 μ L de uma suspensão celular de HUVEC, SC ou K562, ajustadas à concentração de 5×10^5 células/mL em tampão de adesão contendo 0,1% de BSA, e as placas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 410 xg por 2 min a 4°C para aproximar as células do fundo dos poços. As placas foram então incubadas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA) por 1 hora.

Após este período, o conteúdo dos poços foi vertido e as placas foram lavadas com 200 μ L de tampão de adesão. Foram adicionados 100 μ L dos compostos diluídos em tampão de adesão: DisBa-01 livre ou incorporada em micelas ou apenas tampão de adesão como controle. As células HUVEC e SC também foram expostas em ensaio a parte ao anticorpo comercial anti-CD51/CD61, que se liga à integrina $\alpha v \beta 3$, ou ainda isotipos controles IgG1 κ . Tais placas foram então incubadas a 37°C por 1:30 hora. Após este período, as placas foram lavadas com tampão de adesão para retirar todas as células não aderidas. A seguir, foi realizada uma quantificação por cristal violeta, como descrito no Item 3.13. Os resultados foram expressos em quantidade de células por mililitro, calculados com base em uma curva contendo concentrações conhecidas de células.

3.13. Quantificação celular por cristal violeta

As placas contendo células aderidas resultantes do ensaio de inibição da adesão (Item 3.11) ou de descolamento celular (item 3.12) foram fixadas com 50 μ L/poço de

etanol absoluto a temperatura ambiente por 10 min. Então, o fixador foi descartado e as células foram expostas a 50 µL de uma solução de cristal violeta 0,1% diluída em metanol 0,1% por 30 min. As placas foram lavadas com tampão de adesão, de forma previamente padronizada: 200 µL/poço, 3 lavagens, deixando o líquido de lavagem por 30 segundos a cada vez. Após o líquido ter sido descartado, o cristal violeta foi então solubilizado com 100 µL de solução de lise composta de triton X-100 1% diluído em etanol 50% e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm.

3.14. Observação da *anoikis*

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

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método de MTT (MOSMANN, 1983). A suspensão celular de HUVEC, K562 ou SC, no meio preferencial de cada célula, a 5×10^5 células/mL foi exposta à solução de DisBa-01 a 10 µM diluída em tampão de adesão ou apenas tampão de adesão (controle), em volumes iguais, por 30 min a 37°C. Às placas de cultura estéreis sensibilizadas com fibronectina ou vitronectina (Item 3.9), foram distribuídos 100 µL da solução celular por cavidade, em duplicata. As placas sensibilizadas com BSA (controle de adesão, Item 3.9) foram expostas às soluções celulares contendo apenas células e tampão de adesão. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA).

Posteriormente, as células não aderidas foram retiradas por aspiração e transferidas para uma placa de cultura estéril e 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 xg 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. Após, foram acrescentados 100 µL de uma solução de MTT a 1 mg/mL em meio de cultura incompleto 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 as células que foram expostas apenas ao tampão e que se mantiveram aderidas como 100% de viabilidade.

3.14.2. Preparo das células para os testes de apoptose

Rapidamente, às placas de cultura estéreis de 48 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) sensibilizadas com vitronectina ou fibronectina, (Item 3.9), foram distribuídos 500 µL por cavidade das suspensões celulares de HUVEC, K562 ou SC, ajustadas à concentração de 1×10^5 células/mL no meio de cultura preferencial de cada uma, em presença de 500 µL de uma solução de DisBa-01 a 10 µM diluída em tampão de adesão ou apenas tampão de adesão (controle negativo). As placas sensibilizadas com BSA (controle de adesão, Item 3.9) foram expostas às soluções celulares contendo apenas células e tampão de adesão. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA).

As células não aderidas foram aspiradas para um tubo de ensaio mantido em banho de gelo. As células que se mantiveram aderidas foram lavadas por acréscimo e descarte de 1 mL de tampão de adesão e tripsinizadas, e então recolhidas para outro tubo de ensaio mantido em banho de gelo.

3.14.3. Apoptose por anexina V

A metodologia foi realizada utilizando o kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (eBioscience), conforme instruções do fabricante. As células de cada tubo de ensaio foram centrifugadas a 300 xg por 5 min, e foram adicionados os reagentes do kit a cada tubo de ensaio: 100 µL de tampão de ligação (“Binding Buffer”), 5 µL de anexina V-FITC e 5 µL de iodeto de propídio. Após incubação de 10 minutos, 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.

3.14.4. Apoptose por Apo-Direct

A técnica foi realizada utilizando-se o kit APO-Direct (eBioscience), conforme instruções do fabricante. As células de cada tubo de ensaio foram centrifugadas a 300 xg por 5 min, e foram adicionados a cada tubo de ensaio 100 µL de tampão de fixação (paraformaldeído 1%), e incubadas por 45 minutos a 4°C. As células foram lavadas com tampão fosfatado salino e dispersas em uma solução de etanol 70% gelado (mantido a -20°C), e incubadas por 30 min a -20°C. Após serem fixadas, as células foram tratadas com os reagentes contidos no kit de ensaio: foram lavadas 2 vezes com 1 mL de tampão de lavagem (“Wash Buffer”), e então foram dispersas em 50 µL de solução de marcação (“Staining Solution”) e incubadas por 60 min a 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes, como no passo anterior, e a seguir foram dispersas em 500 µL de uma

solução de RNase/Iodeto de Propídio e incubadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A leitura foi feita em citômetro de fluxo FACS CANTO.

3.15. Produção de mediadores em presença de vitronectina ou fibronectina

Às placas sensibilizadas (Item 3.9) foram distribuídos 200 µL por cavidade das suspensões de cada linhagem celular, ajustadas à concentração de 5×10^5 células/mL no meio de cultura preferencial de cada uma, e as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Placas contendo apenas BSA foram utilizadas como controle. Após esta incubação, os sobrenadantes foram removidos e as placas foram lavadas com tampão de adesão para remover células não aderentes. O meio de cultura foi repostado e a placa foi incubada nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes obtidos das placas de culturas foram coletados e estocados em freezer a -20°C até o momento da determinação dos mediadores. A determinação dos fatores VEGF-A, IL-8, TGF-β, TNF-α, IL-12 e IL-10 foi realizada em sobrenadantes de todas as linhagens celulares. Estes fatores foram dosados através de kits de ELISA, conforme as instruções do fabricante (eBioscience).

3.16. Produção de mediadores em presença das formulações contendo a desintegrina recombinante

Às placas de cultura estéreis de 96 cavidade de fundo plano (Corning, Inc.), não sensibilizadas, foram distribuídos 100 µL por cavidade das suspensões celulares da linhagem celular K562 ou SC, ajustadas à concentração de 5×10^5 células/mL no meio de cultura preferencial, em presença de 100 µL de DisBa-01 livre a 10 ou 5 µM, micelas controle (M-C) ou contendo a desintegrina (M-DB) a 20 ou 10 mg de lipídeos/mL, LPS a 10 e 5 µg/mL, PMA a 20 e 5 ng/mL ou apenas tampão (controle negativo), em

duplicata. Para a linhagem HUVEC, foram adicionados 200 μL de células a uma concentração de 5×10^4 células/mL no meio de cultura preferencial, e a placa foi incubada *overnight* a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific, EUA). O sobrenadante da placa de cultura de HUVEC foi descartado, e então foram adicionado 100 μL do meio cultura e mais 100 μL de cada um dos compostos, como realizado para as outras linhagens. As placas de cultura de todas as linhagens foram então incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO_2 por 24 horas. Após esta incubação, os sobrenadantes obtidos das placas de culturas foram coletados e estocados em freezer com temperatura constante de -20°C até o momento da determinação dos mediadores. A determinação dos fatores VEGF-A, IL-8, TGF- β , TNF- α , IL-12 e IL-10 foi realizada em sobrenadantes de todas as linhagens celulares. Estes fatores foram dosados através de kits de ELISA, conforme as instruções do fabricante (eBioscience).

3.17. Análise estatística

Para todas as análises realizadas, exceto aquelas derivadas dos resultados envolvendo citometria de fluxo, as amostras foram primeiro classificadas como amostras normais após serem previamente analisadas pelo teste de Kolgomorov-Smirnov. A análise estatística foi realizada utilizando um método de análise de variância (one-way ANOVA), seguido pelo teste *t*-Student, se necessário na versão de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, para avaliar a diferença significativa entre pares.

A análise estatística para os ensaios de citometria de fluxo foi realizada utilizando um método de análise de variância do tipo one-way ANOVA de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn para avaliar a diferença

significativa entre cada marcação fenotípica em cada grupo em relação ao seu equivalente no grupo controle.

Para todos os casos, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção da desintegrina recombinante *DisBa-01*

A Figura 4 apresenta os códons e respectivos aminoácidos da desintegrina recombinante *DisBa-01*. Durante a expressão da desintegrina, pôde-se observar uma gama de proteínas presentes no extrato celular ou no sobrenadante da cultura, antes e após a indução com IPTG (Figura 5A). Esta quantidade parece ser mais significativa após a indução com IPTG, principalmente no extrato celular lisado ou no sobrenadante após 3 horas de indução (S2). Seguiu-se uma etapa de purificação de S2.

A Figura 5B demonstra a etapa da purificação feita em resina de níquel, em gel SDS-PAGE. Observou-se que as frações eluídas apresentaram maiores quantidades de proteína com peso molecular aproximado dentro do esperado de aproximadamente 12 kDa, visto que a proteína *DisBa-01* pesa 11,637 kDa. Estas frações passaram por uma nova etapa de purificação: a troca iônica (Figura 5C).

A cada etapa de produção da desintegrina recombinante, para cada 2 litros de meio de cultura contendo as bactérias obtinha-se uma quantia final de 2 a 5 mg de desintegrina em solução aquosa.

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 4. Sequência de códons e aminoácidos correspondentes à desintegrina recombinante DisBa-01 que foi inserida no plasmídeo pET28a-DisBa-01. Os códons marcados em cinza representam a sequência RGD, passível de se ligar à integrina $\alpha v\beta 3$ ou $\alpha IIb\beta 3$; o códon marcado com * representa o códon de parada. Fonte: Gonçalves, 2008.

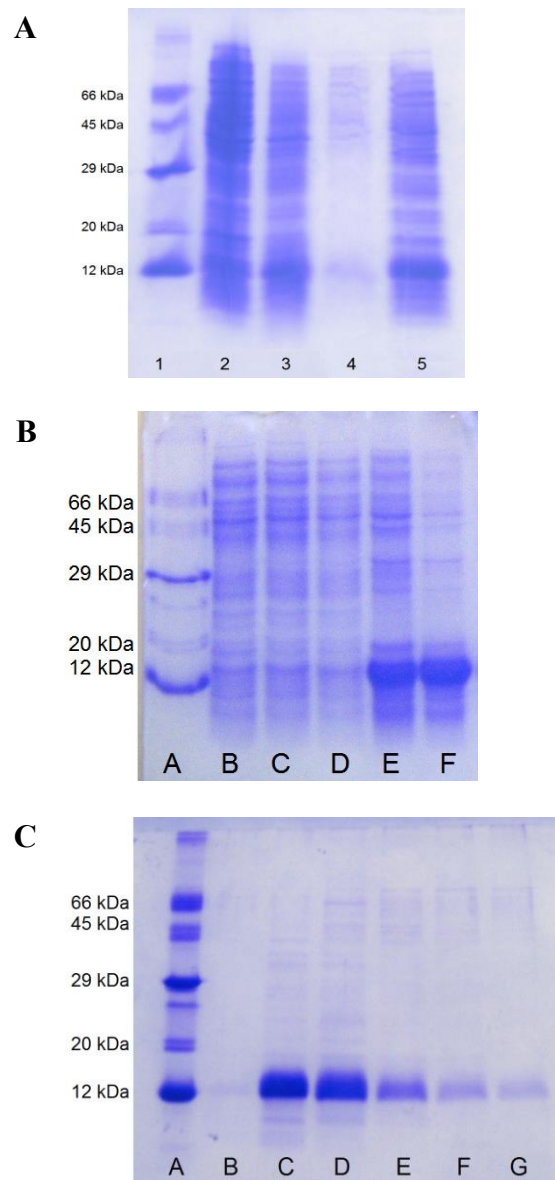


Figura 5. Géis de SDS-PAGE mostrando etapas da expressão e purificação de DisBa-01. (A) Indução protéica, da esquerda para a direita: padrão molecular; extrato celular lisado antes da indução; extrato celular lisado após 3 horas de indução; sobrenadante de cultura antes da indução (S1); sobrenadante de cultura 3 horas após indução (S2). (B) S2 após a cromatografia de afinidade em resina de níquel, mostrando o padrão molecular à esquerda e as diversas frações eluídas na purificação. (C) Frações obtidas após cromatografia em resina de níquel e então submetidas a uma cromatografia de troca iônica, mostrando o padrão molecular à esquerda e as diversas frações eluídas na purificação.

4.2. Caracterização das micelas

Existe uma relação complexa entre as características físicas e químicas de uma nanopartícula e sua interação com um sistema biológico. Propriedades como diâmetro, carga e a superfície da partícula podem modificar amplamente a biocompatibilidade, estabilidade, funções terapêuticas e efeitos colaterais (ZHANG et al., 2012). A Figura 6 demonstra o aspecto macroscópico da solução antes e após a sonicação. As principais características das micelas contendo (M-DB) ou não (M-C) a proteína recombinante DisBa-01 estão demonstradas na Tabela 1.

A presença da desintegrina nas preparações gera um diâmetro médio para M-DB de $196,17 \pm 14,33$ nm, significativamente maior do que o diâmetro médio de M-C, de $111,30 \pm 2,97$ nm ($p < 0,01$), o que poderia indicar que a desintegrina está sendo incorporada pelas micelas. Além disso, ambas as amostras apresentam um perfil bimodal, isto é, a maioria de suas partículas apresenta o diâmetro citado (mais de 70%), entretanto partículas de tamanhos diversos, geralmente menores, também foram formadas.

Em relação ao diâmetro, o tamanho ideal de nanopartículas com uso terapêutico é de 10 nm a 1 μ m, pois este tamanho gera uma biodistribuição diferente em relação às moléculas não inseridas em veículos. O limite inferior é devido aos coeficientes de filtração nos capilares glomerulares renais, que filtram livremente partículas de até 10 nm. As partículas entre 10 e 200 nm tendem a ser menos captadas pelo sistema retículo-endotelial ou removidas pelo baço ou fígado, ficando mais tempo em circulação e conseguem extravasar pelos poros dos capilares com facilidade (BEIJA et al., 2012). Por este conjunto de fatores, as nanopartículas obtidas no presente estudo parecem apresentar um tamanho adequado para um futuro uso terapêutico.

A**B**

Figura 6. Solução de fosfatidilcolina de soja e polissorbato 80 em tampão fosfatado salino contendo a desintegrina recombinante DisBa-01. (A) Antes de sonicar, ainda sem a formação de micelas. (B) Após sonicar, já com as micelas formadas.

Tabela 1. Características das micelas contendo (M-DB) ou não (M-C) a desintegrina recombinante DisBa-01.

	M-DB	M-C
Diâmetro	196,17 ± 14,33 nm **	111,30 ± 2,97 nm
Índice de Polidispersidade	0,27 ± 0,01	0,42 ± 0,03
Potencial Zeta	+1,04 ± 0,06 mV ***	-5,59 ± 0,57 mV

One-way ANOVA e t-Student, comparado ao controle: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Em relação ao índice de polidispersidade, todas as amostras testadas apresentaram um índice baixo (M-DB: $0,27 \pm 0,01$; M-C: $0,42 \pm 0,03$), sem diferenças significativas entre eles ($p > 0,05$). A polidispersidade surge naturalmente com a distribuição do tamanho e a forma de uma nanopartícula, derivando de flutuações energéticas e influenciando na estabilidade da molécula (NIEDERQUELL & KUENTZ, 2013). Desta forma, quanto menor o índice de polidispersidade, mais homogênea é a nanopartícula em relação ao seu diâmetro (BERTI et al., 2011). Este dado é importante, pois micelas mistas, compostas de lipídeo e surfactante, apresentam modulação na captação do fármaco disperso no meio influenciável pelo índice de polidispersidade, principalmente em relação ao surfactante: quanto menor o índice, maior a retenção do fármaco no interior da partícula (KOGA et al., 2000). O índice baixo apresentado pelas micelas indicam a estabilidade e homogeneidade do sistema, mesmo após a incorporação da desintegrina recombinante DisBa-01.

O potencial zeta das micelas contendo ou não DisBa-01 também foi avaliado. Esta medida avalia a carga superficial de uma partícula, e esta carga pode influenciar na estabilidade das suspensões coloidais. As amostras M-C foram as que apresentaram potencial mais elevado, de $-5,59 \pm 0,57$ mV, enquanto que M-DB apresentou $+1,04 \pm 0,06$ mV ($p < 0,001$), demonstrando que a presença da desintegrina é capaz de alterar as cargas do sistema, e indicando que as amostras M-C são possivelmente as mais estáveis.

Um valor de potencial zeta entre 30 a 60 mV, de cargas positivas ou negativas, é considerado importante para a estabilidade de um sistema nanoparticulado, uma vez que as forças repulsivas evitam agregações entre as partículas em dispersão (DOMINGUES et al., 2008; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ & RABASCO, 2011). Entretanto, os lipídios sintéticos e naturais são em geral *zwitterion*, ou seja, possuem regiões com carga positiva e negativa, que se analisadas como um todo, podem se anular. Assim, as

partículas sintetizadas com lipídeos naturais podem ter uma carga superficial menos significativa (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ & RABASCO, 2011), o que corresponde aos resultados obtidos.

Não obstante, a presença de cargas mais notáveis em um sistema nanoparticulado também influencia o destino deste no organismo. A carga superficial positiva facilita a interação com componentes da membrana plasmática das células, facilitando a endocitose mediada por clatrina, comum em diversas células, enquanto cargas negativas geram uma interação diferente que pode induzir à internalização através da via caveolar, sendo útil quando se quer focar em monócitos/macrófagos, mas podendo acarretar maior eliminação das partículas do organismo (BEIJA et al., 2012). Assim sendo, a carga final obtida para as micelas não é grande o bastante para melhorar a estabilidade do sistema, mas é o que se espera de partículas sintetizadas com lipídeos naturais, e estes, assim como a fosfatidilcolina, apresentam a vantagem de serem biocompatíveis (MYERS, 2006).

4.3. Avaliação do perfil de SAXS

Para sistemas formados por partículas correlacionadas, como micelas, as curvas de SAXS tendem a apresentar um pico largo e suave (Figura 7). As curvas de SAXS para M-C e M-DB apresentaram um pico de correlação amplo, típico da estrutura incorporada em micelas. A intensidade máxima e a sua posição não diferiu significativamente entre as amostras contendo ou não a desintegrina DisBa-01, indicando que a incorporação proteica não afeta a nanoestrutura das micelas.

Já é conhecido que a concentração de surfactante influencia a estrutura do sistema. Em baixas concentrações, abaixo da concentração micelar crítica (CMC), um sistema composto de água, óleo e surfactante gera uma intensidade de SAXS similar ao

que é obtido para partículas diluídas monodispersas. Entretanto, se a concentração do surfactante estiver acima do CMC, ocorrem interações entre as moléculas de surfactante (GUINIER, 1964). No presente trabalho, o surfactante polissorbato 80 foi utilizado em uma concentração acima do CMC, conforme descrito pelo fabricante (CMC = 13-15 mg/mL, Sigma-Aldrich), e a formação de micelas era, portanto, esperada.

4.4. Eficiência de encapsulação

O método foi realizado tanto para as preparações contendo a proteína quanto para o vazio, visto que lipídeos e diversos elementos do tampão são conhecidos por gerar um falso-positivo na reação de Lowry, como descrito pelo próprio autor da técnica (LOWRY et al., 1951). A quantidade absoluta de proteína no exterior das micelas foi muito maior para as preparações contendo a desintegrina DisBa-01 do que para aquelas não contendo, como era esperado (M-C: $2,32 \pm 0,98 \mu\text{g}$; M-DB: $41,76 \pm 4,16 \mu\text{g}$; $p < 0,001$). Em termos relativos, M-DB apresentou uma eficiência de encapsulação média de $27,54 \pm 5,21\%$ em relação à desintegrina inicialmente exposta ao sistema.

Esta encapsulação média pode ser considerada satisfatória visto que nanopartículas contendo lipídeos tendem a apresentar uma taxa de encapsulação bastante reduzida e, às vezes, podem apresentar problemas de instabilidade se confrontadas com uma carga muito alta de componentes não lipídicos ou não surfactantes (BUNJES, 2010). Ainda, as micelas preparadas contêm apenas fosfatidilcolina e polissorbato 80, não possuindo colesterol ou esfingomielina em sua superfície, e é relatado que, pelo menos em relação a lipossomas, estes componentes auxiliam na retenção de moléculas (ALLEN & CULLIS, 2013).

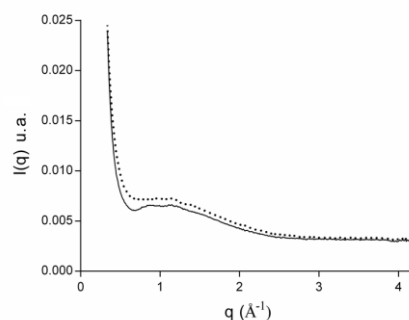


Figura 7. Curvas de SAXS. No gráfico, linha pontilhada: M-DB; linha pontilhada: M-C. Os resultados estão expressos como a intensidade em função do vetor de espalhamento q (unidades arbitrárias) *versus* o vetor q em Angstroms invertidos. Não há diferenças significativas entre as curvas.

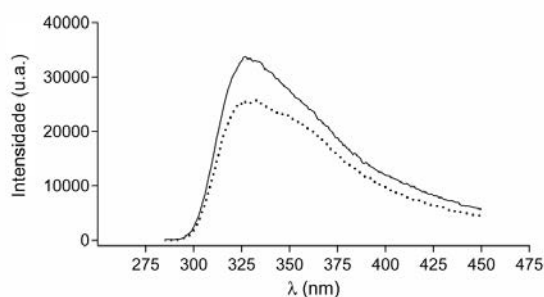


Figura 8. Espectroscopia de fluorescência. No gráfico, linha contínua: desintegrina DisBa-01 livre; linha descontínua: micela contendo a desintegrina (M-DB) diluído 1:100 em água milli-Q. Os resultados estão expressos em intensidade (unidades arbitrárias) *versus* comprimento de onda (nm); não há diferenças significativas entre os grupos.

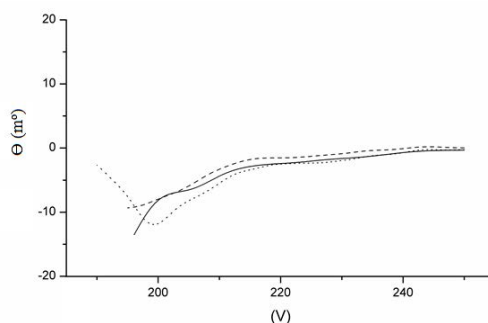


Figura 9. Espectroscopia de dicroísmo circular. No gráfico, linha pontilhada: desintegrina DisBa-01 livre; linha contínua: M-DB diluído 1:50 em água milli-Q; linha tracejada: M-DB diluído 1:25 em água milli-Q. Os resultados estão expressos em elipticidade (miligrados) *versus* tensão elétrica (V); não há diferenças significativas entre os grupos. A alteração na elipticidade ocorrida frente a tensões elétricas abaixo de 210 V tende a ser derivada dos sais do tampão ou outros elementos em solução.

4.5. Avaliação estrutural da proteínas por espectroscopia de fluorescência e espectroscopia de dicroísmo circular

A espectroscopia de fluorescência detecta o espectro da radiação emitida pela proteína, quando esta sai do estado excitado para o fundamental. Alterações no padrão do espectro de emissão ou na posição dos máximos de emissão são utilizados para inferir modificações na molécula ou na sua interação com o meio que a circunda (LAKOWICZ & THOMPSON, 1983). Como observado na Figura 8, a encapsulação da proteína DisBa-01 em micelas não altera a fluorescência da molécula no seu padrão de emissão se comparada à proteína livre.

A espectroscopia de dicroísmo circular observa a diferença de absorção da luz polarizada de forma circular, que resulta de assimetrias estruturais. Tais alterações podem ser resultados de modificações conformacionais (SREERAMA & WOODY, 2001). Como observado na Figura 9, não parece haver alteração significativa na absorção de luz polarizada, o que indica que não houve alteração conformacional da proteína após seu encapsulamento na micela.

Como se supõe um uso clínico de tais nanopartículas, é interessante que o composto estudado não sofra alterações conformacionais que poderiam modificar seu uso conhecido enquanto molécula livre.

4.6. Citotoxicidade celular

A desintegrina DisBa-01 parece gerar morte celular para a linhagem HUVEC, mas esta perda de viabilidade não é significativa nas primeiras 24 horas ($p > 0,05$, Figura 10A), sendo importante apenas após 48 horas ($p < 0,05$, Figura 10B) de exposição. Além

disto, M-DB afetou a viabilidade celular após 48 horas em ambas as concentrações testadas ($p < 0,05$), apesar de que resultado similar também foi observado para M-C.

Ao se observar as células SC, nota-se que apenas M-DB a 20 mg/mL altera a viabilidade após 24 horas ($p < 0,05$) de exposição, mas não após 48 horas ($p > 0,05$). A desintegrina livre ou qualquer outro composto testado não afetou a viabilidade celular ($p > 0,05$). Para a linhagem K562, a desintegrina livre ou incorporada em micelas não provocou morte celular significativa em nenhum dos períodos testados ($p > 0,05$), o que era esperado, visto que esta linhagem celular não possui a desintegrina $\alpha v \beta 3$ (GENTILUCCI et al., 2010) à qual a desintegrina é capaz de se ligar (RAMOS et al., 2008).

A ligação entre proteínas da matriz extracelular e a integrina $\alpha v \beta 3$ está relacionada ao aumento de sobrevivência celular (KONSTANTOPOULOS & THOMAS, 2009), mas não foi encontrada nenhuma evidência na literatura de que a ligação e o bloqueio desta integrina possa acarretar morte celular por si só. Não obstante, já havia sido realizado um trabalho observando a citotoxicidade que poderia vir a ser causada por DisBa-01 em diversas doses e ficou evidenciado que esta desintegrina não parece ser tóxica de forma importante (RAMOS et al., 2008), como também foi observado aqui para 24 horas, apesar de haver uma perda de viabilidade significativa após 48 horas de exposição.

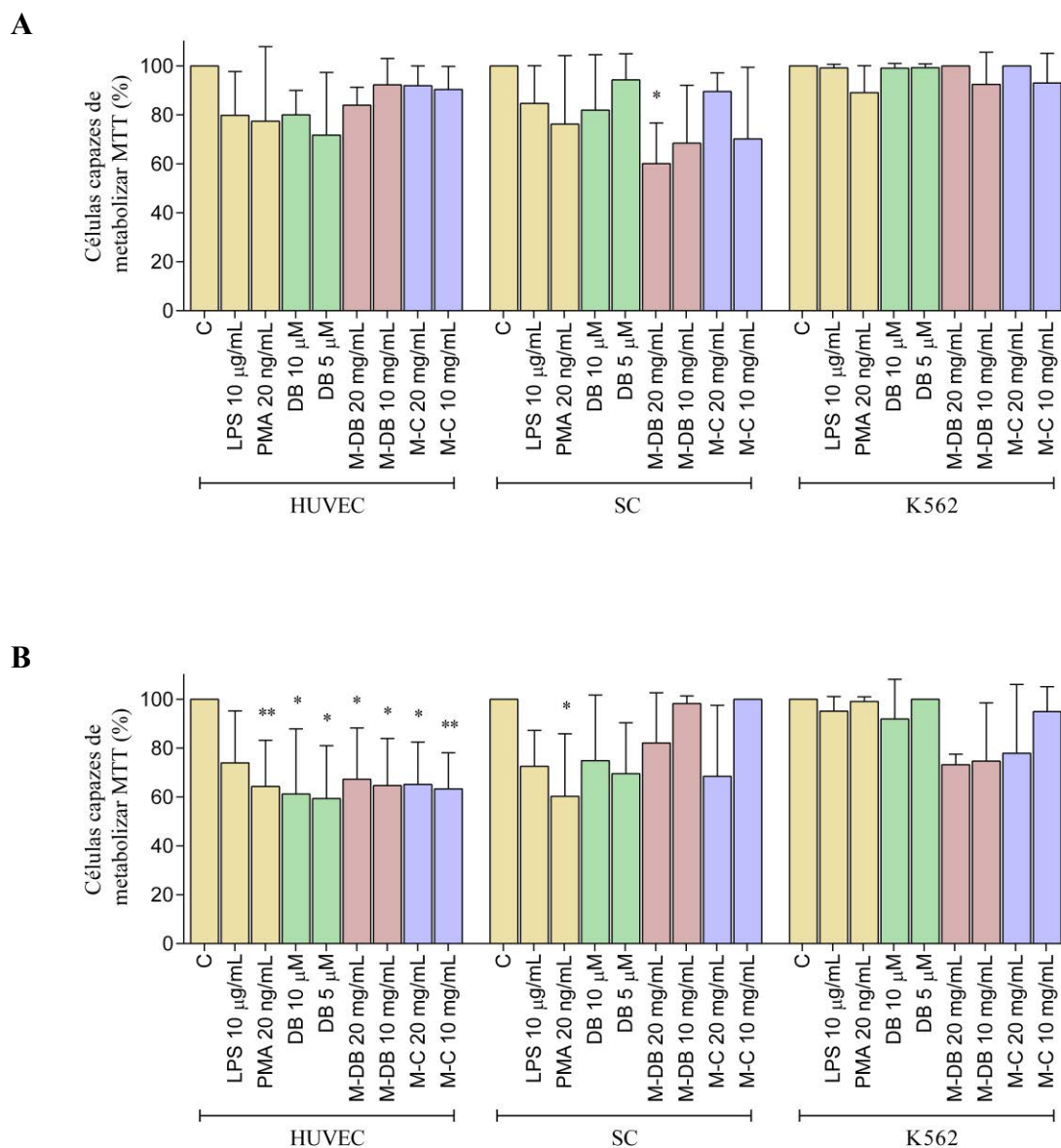


Figura 10. Citotoxicidade celular após exposição aos compostos. (A) 24 horas de exposição; (B) 48 horas de exposição. HUVEC, SC e K562 foram expostas a C: controle de células expostas apenas ao tampão de adesão; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; PMA: acetato miristato de forbol; DB: desintegrina DisBa-01; M-DB: micela contendo a desintegrina; M-C: micela controle. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.7. Inibição da adesão celular

Como observado na Figura 11A, parece que a desintegrina, em sua forma livre ou incorporada em micelas, em todas as concentrações testadas, altera significativamente a adesão celular da linhagem HUVEC à vitronectina ($p < 0,001$). Entretanto, M-C também afeta de forma importante a adesão celular ($p < 0,001$), de modo que os resultados obtidos para M-DB poderiam ser devido à atuação da desintegrina em si ou à presença dos componentes da micela, ou a ambos os fatores simultaneamente. É interessante notar, ainda, que os resultados obtidos para a redução de adesão não indicam, majoritariamente, uma perda de viabilidade causada pela desintegrina ou pelos componentes da micela diretamente nas células, já que foi observado anteriormente que a desintegrina livre e as micelas não alteram significativamente a viabilidade das células HUVEC em uma placa de cultura não sensibilizada em 24 horas (Item 4.6).

Por outro lado, as células SC apresentam uma redução da adesão celular frente apenas à menor concentração testada de M-C quando expostas à vitronectina ($p < 0,05$, Figura 11A), e às maiores concentrações testadas de M-DB e M-C quando expostas à fibronectina ($p < 0,01$, Figura 11B), indicando que possivelmente a presença dos lipídeos e surfactante possam impactar a adesão. Similarmente, pode ser notado também no teste de viabilidade celular (Item 4.6), que este se apresenta alterado frente a M-DB.

As células K562 não sofrem perda de adesão importante frente à desintegrina ($p > 0,05$, Figura 11B), como era esperado, e também não parecem sofrer alterações de adesão devido à presença das micelas ($p > 0,05$).

Para averiguar a possibilidade da atuação da desintegrina em receptores celulares específicos, no caso das linhagens HUVEC e SC, em $\alpha v \beta 3$, foi utilizado um anticorpo comercial competidor (anti-CD51/61). Observando a Figura 12, nota-se

claramente que a presença dos anticorpos competidores gera pouca perda de adesão ($p>0,05$). Parece que as células HUVEC e SC podem se aderir à vitronectina por outros receptores ou que tais anticorpos não são tão efetivos em sua atuação competitiva na situação testada. Ainda, para as células HUVEC, a presença da desintegrina livre a 10 μM simultaneamente aos anticorpos anti-CD51/61 a 20 $\mu\text{g/mL}$ ou do isotipo controle IgG1 κ a 40 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,001$ quando comparado o teste ao controle nestas situações citadas) geram resultados similares de perda de adesão em relação àqueles observados frente apenas à desintegrina, sem diferenças entre eles ($p>0,05$). O mesmo ocorre com a linhagem SC, que não apresenta nenhuma alteração no perfil de adesão quando DisBa-01 está livre na presença ou ausência do anti-CD51/61, enfatizando novamente a pouca efetividade do anticorpo competidor neste cenário. Mais estudos serão necessários para se observar o motivo da pouca atuação do anticorpo competidor.

Em todas as situações, a desintegrina DisBa-01 influenciou de forma importante a adesão celular da linhagem HUVEC à vitronectina. Este resultado era esperado visto que a inibição de adesão para algumas linhagens celulares portando a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ já era relatada anteriormente (RAMOS et al., 2008) e as células HUVEC possuem grande quantidade desta integrina em sua superfície, sendo considerada um modelo de estudo em relação a isto (TEKLEMARIAM et al., 2011). As células K562 são conhecidas por não possuírem a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ (GENTILUCCI et al., 2010) e supostamente sequer são capazes de expressar a subunidade $\beta 3$, exceto em situações peculiares (JARVINEN et al., 1993), subunidade esta à qual a desintegrina DisBa-01 se liga (RAMOS et al., 2008). Desta forma, a ausência de inibição de adesão neste caso era esperada e utilizada como um controle de especificidade.

A linhagem SC difere das anteriores por não possuir muitos estudos a seu respeito. Esta linhagem é considerada similar a monócitos/macrófagos humanos, tendo

sido obtida de monócitos normais e então imortalizados (YAMAMOTO et al., 2007). Em situações fisiológicas, os monócitos e macrófagos e algumas células derivadas da medula óssea são provavelmente as únicas células do organismo capazes de expressar a integrina $\alpha\beta3$, mas o fazem em quantidade pouco notável (DESGROSELLIER & CHERESH, 2010). Pelo resultado obtido, pode-se supor que a adesão celular não está sendo feita somente através da integrina $\alpha\beta3$ e outros componentes celulares podem estar influenciando esta adesão. Estes dados são bastante promissores já que demonstram que a desintegrina DisBa-01 poderia ser utilizada futuramente na terapia anticâncer com certa seletividade para células tumorais que possuam a integrina $\alpha\beta3$, possivelmente sem influenciar drasticamente as células da medula óssea.

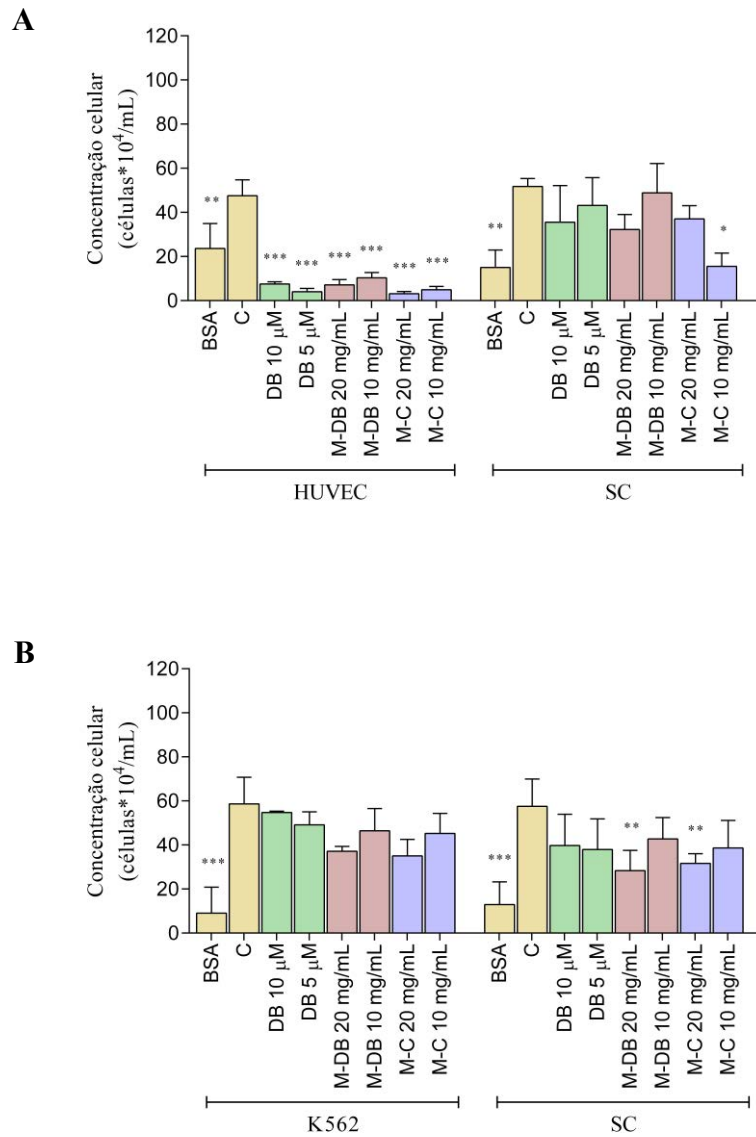


Figura 11. Inibição da adesão celular frente à DisBa-01 livre ou incorporada em micelas. As células HUVEC e SC foram expostas aos compostos e posteriormente à vitronectina, enquanto as células K562 e SC foram expostas aos compostos e posteriormente à fibronectina, exceto no controle de BSA. BSA: soroalbumina bovina a 1%, utilizado como “coating” na placa de cultura, C: controle de células expostas apenas ao tampão de adesão; DB: desintegrina DisBa-01 livre; M-DB: micela contendo a desintegrina; M-C: micela controle. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

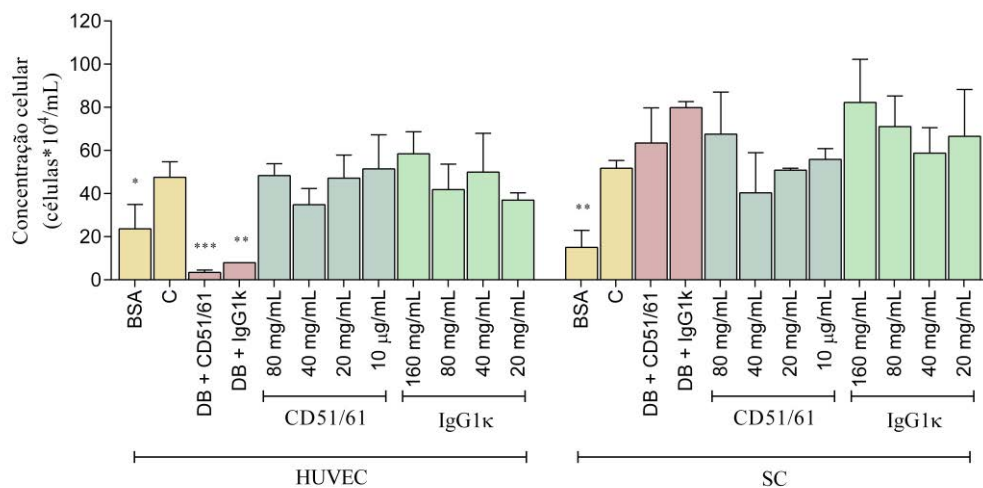


Figura 12. Inibição da adesão celular frente a anticorpo anti-CD51/61. As células HUVEC ou SC foram expostas aos compostos e posteriormente expostas a placas de cultura contendo “coating” de vitronectina, exceto em BSA. BSA: soroalbumina bovina a 1%, utilizada como controle de adesão; C: controle de células expostas apenas ao tampão de adesão; DB: desintegrina DisBa-01 a 10 μM; CD51/61: anticorpo anti-CD51/61 a 20 mg/mL ou na concentração indicada; IgG1κ: isotipo controle do tipo IgG1κ a 40 mg/mL ou na concentração indicada. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.8. Descolamento celular

Como observado na Figura 13A, as células HUVEC ou SC não sofreram influência na perda de adesão gerada pela desintegrina livre ou incorporada em micelas ($p>0,05$) após já estarem firmemente aderidas à matriz extracelular. Em relação à fibronectina (Figura 13B), as linhagens K562 ou SC também não responderam à desintegrina em nenhuma condição experimental ($p>0,05$), como era esperado.

À parte, foram utilizados anticorpos competidores anti-CD51/61 na cultura celular de células HUVEC ou SC que estavam aderidas à vitronectina (Figura 14), e não foi observada nenhuma resposta ($p>0,05$). Estes resultados podem sugerir que, uma vez aderida, a linhagem não perde adesão mediante os compostos testados.

Estes resultados poderiam ser supostos já que a ligação das células à vitronectina ocupa o sítio ativo da integrina $\alpha v\beta 3$, tornando improvável a união entre DisBa-01 e $\alpha v\beta 3$ na região mais próxima a este sítio, onde foi pressuposta por Ramos e colaboradores (2008).

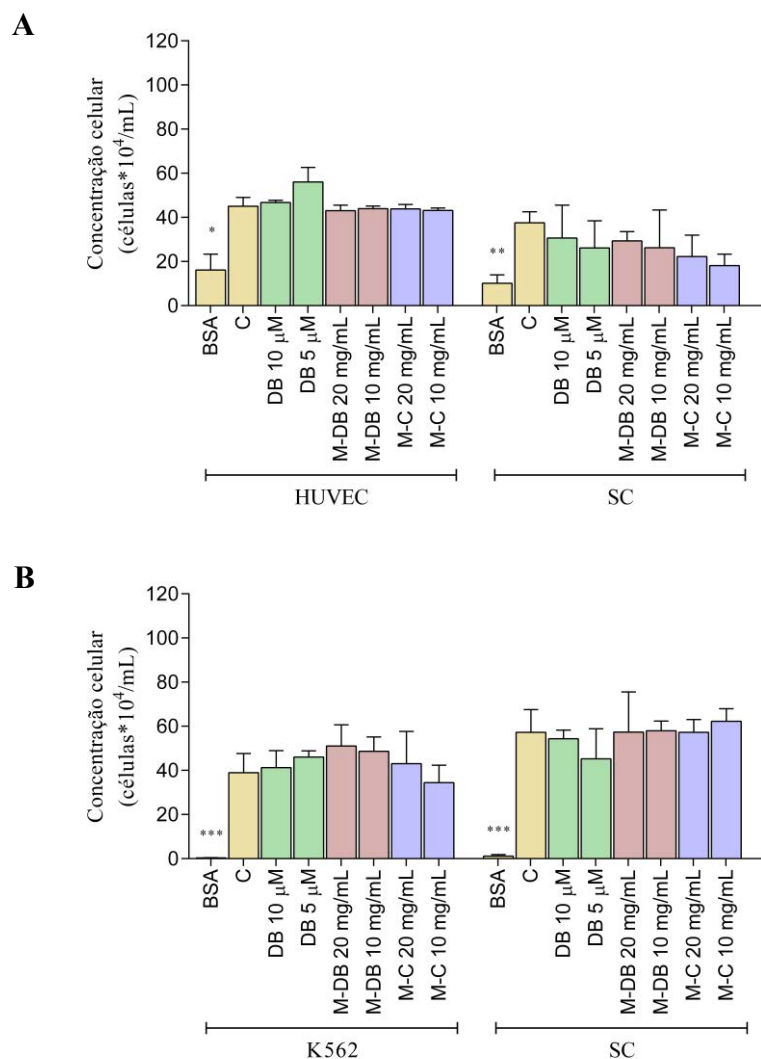


Figura 13. Descolamento celular em linhagens expostas à desintegrina recombinante DisBa-01. As células HUVEC e SC foram expostas previamente a placas de cultura contendo “coating” de vitronectina, enquanto as células K562 e SC foram expostas a placas com “coating” de fibronectina, exceto em BSA. BSA: soroalbumina bovina a 1%, utilizada como controle de adesão; C: controle de células expostas apenas ao tampão de adesão; DB: desintegrina DisBa-01 livre; M-DB: micela contendo a desintegrina; M-C: micela controle. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

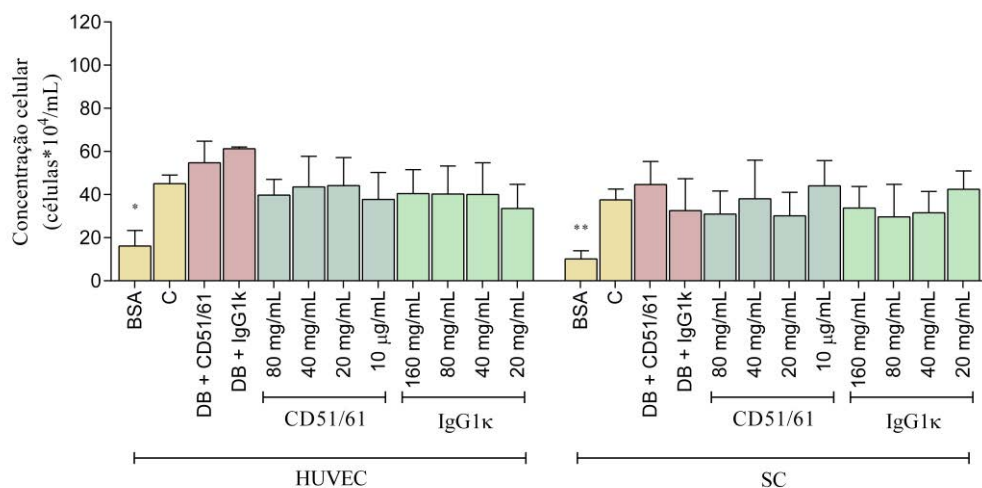


Figura 14. Descolamento celular frente a anticorpo anti-CD51/61. As células HUVEC ou SC foram expostas a placas de cultura contendo “coating” de vitronectina, exceto em BSA, e posteriormente expostas aos compostos. BSA: soroalbumina bovina a 1%, utilizada como controle de adesão; C: controle de células expostas apenas ao tampão de adesão; DB: desintegrina DisBa-01 a 10 µM; CD51/61: anticorpo anti-CD51/61 a 20 mg/mL ou na concentração indicada; IgG1κ: isotipo controle do tipo IgG1κ a 40 mg/mL ou na concentração indicada. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.9. Anoikis

4.9.1. Viabilidade celular por MTT em células aderidas ou não

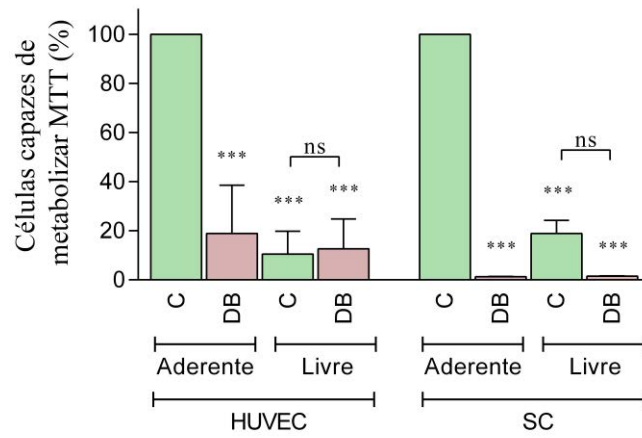
Na linhagem de células HUVEC (Figura 15A), foi observado que a presença de DisBa-01 a 10 μ M foi capaz de reduzir significativamente a formação de cristais de formazana pelas células aderidas quando comparada às que foram expostas somente ao tampão ($p<0,001$). Este resultado gera duas hipóteses: (1) a proteína poderia gerar morte celular diretamente, o que é improvável tendo em vista a reduzida perda de viabilidade em 24 horas de exposição, observada anteriormente (Item 4.6), ou (2) esta pode causar perda de adesão ao substrato, como já é relatado (RAMOS et al., 2008) e também foi observado para a linhagem HUVEC no presente estudo (Item 4.7). A literatura supõe que a perda de adesão poderia então vir a acarretar morte celular (BUCHHEIT et al., 2012). O presente resultado pode corroborar com esta ideia, visto que a presença da desintegrina pode inibir a adesão celular das HUVEC, deixando uma pequena quantia de células aderidas viáveis, e existe também uma pequena quantia de células viáveis não aderidas, sem diferenças entre estes grupos ($p>0,05$), levando a crer que parte das células perderam a capacidade de metabolizar MTT.

Quando a desintegrina é adicionada à cultura celular, a linhagem SC, frente à vitronectina (Figura 15A) ou fibronectina (Figura 15B), demonstra altos índices de células não capazes de metabolizar o sal de MTT, tanto em relação às que se mantiveram aderidas quanto as que não se mantiveram ($p<0,001$). Este resultado poderia indicar que a perda de viabilidade celular para os monócitos/macrófagos não se deve somente à perda de adesão, já que é relatado que a desintegrina não ocasiona perda de adesão celular importante frente à fibronectina (PEDRETTI, 2009) e no presente estudo a perda de adesão da linhagem SC frente à fibronectina, ainda que existente, não é significativa (Item 4.7).

Na linhagem de células K562 (Figura 15B), o tratamento com a proteína DisBa-01 na concentração de 10 μ M resultou em redução significativa das células aderentes capazes de formar os cristais de formazana ($p<0,001$) em comparação ao tampão de adesão. Por ser esta uma linhagem celular com concentração virtualmente nula de integrina $\alpha v\beta 3$ (GENTILUCCI et al., 2010), e por ter sido observado anteriormente que a perda de viabilidade celular em uma placa não recoberta por fibronectina (Item 4.6) ou a perda de adesão frente à fibronectina (Item 4.7) não eram expressivas, este resultado é inesperado. Observa-se também que a presença da desintegrina gera altos níveis de morte celular pressuposta independentemente se a população celular se manteve aderida ($p<0,01$ em relação à população aderida exposta ao tampão) ou se perdeu esta adesão ($p<0,01$ comparada à população não aderida exposta ao tampão).

Como se supõe que a proteína DisBa-01 só modifique significativamente a adesão celular à vitronectina (RAMOS et al., 2008), apesar de que alguma influência de adesão à fibronectina possa existir em altas concentrações, utilizando-se a proteína pelo menos 10 vezes mais concentrada (PEDRETTI, 2009), e ainda tendo em vista os resultados anteriormente obtidos (Itens 4.10 e 4.11), neste momento não podemos supor o mecanismo desta possível perda de viabilidade para K562.

A



B

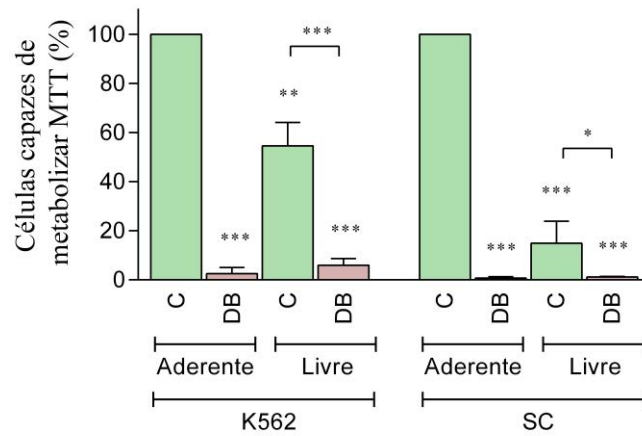


Figura 15. Viabilidade celular em células aderentes ou não expostas a DisBa-01. As células foram expostas a desintegrina ou somente ao tampão, e então expostas à vitronectina (A) ou fibronectina (B). As células aderentes foram analisadas a parte das células que perderam a adesão (livre). Foi considerando como 100% de viabilidade as células expostas ao tampão e que permaneceram aderidas. C: controle de células expostas somente ao tampão de adesão; DB: desintegrina DisBa-01 a 10 μ M. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer, comparado com o controle aderente: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.9.2. Apoptose em células aderidas e não aderidas

O processo de morte celular conhecido como apoptose gera múltiplas alterações morfológicas. Entre elas, durante o processo de apoptose inicial, há a externalização de fosfatidilserina, enquanto que no processo tardio, há a quebra do DNA nuclear. Essas modificações podem ser utilizadas como marcadores, sendo que a fosfatidilserina externalizada pode ser detectada pela proteína anexina V, que acoplada ao fluorocromo FITC, torna 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) (WLODKOWIC et al., 2011).

Como pode ser observado nos experimentos com anexina V (Figura 16), não parece haver apoptose importante neste modelo para nenhuma das linhagens ($p>0,05$). Entretanto, quando a apoptose foi detectada com Apo-Direct (Figura 17), observa-se um aumento significativo de células HUVEC apoptóticas quando as células foram expostas à desintegrina DisBa-01 e não conseguiram se manter aderidas à vitronectina ($p<0,05$). Este resultado coincide com informações da literatura de que a perda de adesão parece levar a apoptose (BUCHHEIT et al., 2012). Este resultado é facilmente correlacionado com a perda da capacidade de metabolizar MTT pelas células HUVEC expostas à DisBa-01 que perderam a adesão. É interessante notar também que tal resultado não foi observado para a linhagem SC ou K562 e, também, que estas células foram menos responsivas à DisBa-01 quanto à citotoxicidade celular (Item 4.6) e à perda de adesão (Item 4.7), demonstrando a especificidade da desintegrina frente a células que expressam maiores quantidades de integrina $\alpha v\beta 3$.

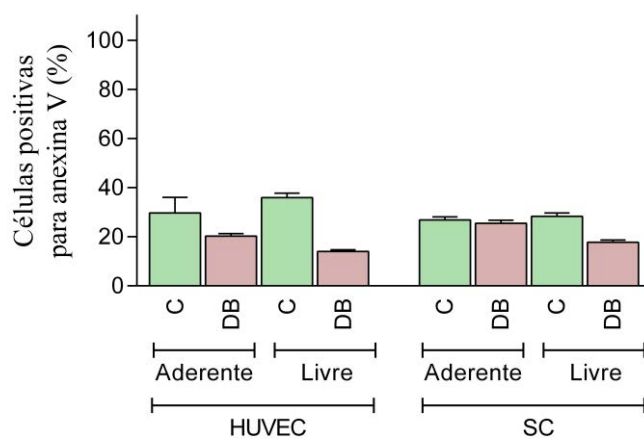
A apoptose em si pode ser bem complicada de identificar e existem numerosas técnicas para a análise da morte celular programada, muitas vezes gerando resultados

contraditórios (WLODKOWIC et al., 2011), principalmente se objetivo for detectar e diferenciar a morte por necrose, detectável por iodeto de propídio (RIEGER et al., 2010). A *anoikis* se torna ainda mais complexa, visto que envolve as vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose dependente de caspase, um mecanismo finamente regulado e que se modula com o tempo e a evolução da célula para a morte (VACHON, 2011). Por estes motivos, o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death*) preconiza que um autor não assegure claramente sobre a morte ou a apoptose (publicação oficial: KROEMER et al., 2009).

Apesar da *anoikis* ser considerada uma forma de apoptose celular (KROEMER et al., 2009), e não ser facilmente detectável, soma-se a isso que dados mais recentes indicam que outras formas de morte celular podem ocorrer quando uma célula perde adesão de seu substrato: necrose, principalmente por acúmulo de radicais livres; autofagia induzida por perda de adesão; necroptose, que é 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).

Não obstante, células imortalizadas e de origem neoplásica podem apresentar resistência à *anoikis*. 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.

A



B

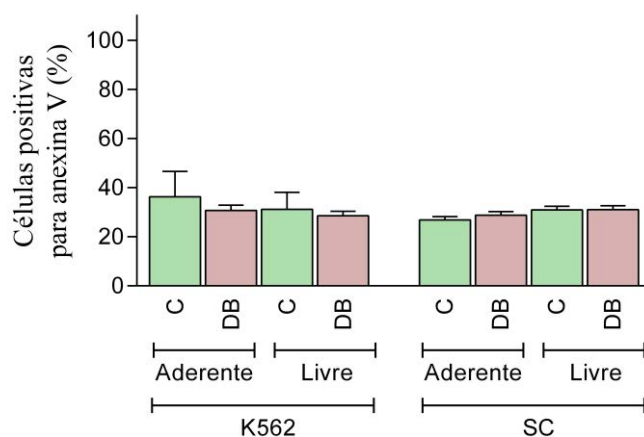


Figura 16. Detecção de fosfatidilserina externalizada na membrana plasmática por anexina V. As células foram expostas à desintegrina DisBa-01 ou somente ao tampão, e então deixadas aderir à vitronectina (A) ou fibronectina (B). As células aderentes foram analisadas a parte das células que perderam a adesão (livre). Foi considerando como 100% de viabilidade as células expostas ao tampão e que permaneceram aderidas. C: controle de células expostas somente ao tampão de adesão; DB: desintegrina DisBa-01 a 10 μ M. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: sem diferenças entre os grupos.

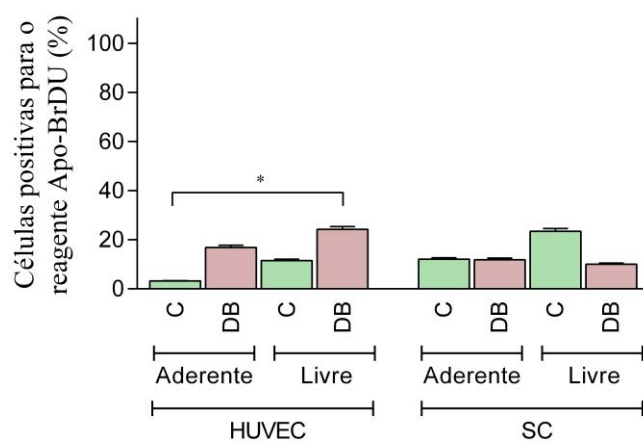
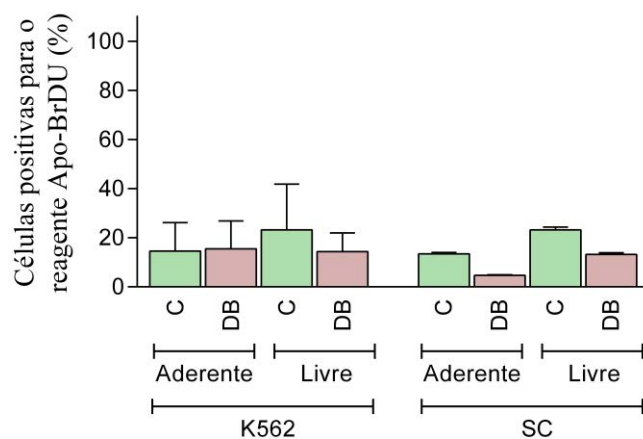
A**B**

Figura 17. Detecção de terminações 3'-OH livres por reagente Apo-Direct. As células foram expostas à desintegrina DisBa-01 ou somente ao tampão, e então deixadas aderir à vitronectina (A) ou fibronectina (B). As células aderentes foram analisadas a parte das células que perderam a adesão (livre). Foi considerando como 100% de viabilidade as células expostas ao tampão e que permaneceram aderidas. C: controle de células expostas somente ao tampão de adesão; DB: desintegrina DisBa-01 a 10 μ M. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: sem diferenças entre os grupos.

4.10. Quantificação de mediadores após a adesão celular

Como observado na Figura 18A, a produção de VEGF-A é mais notável para as células HUVEC, sendo praticamente inexistente para as células K562 e SC. A adesão das células HUVEC à vitronectina não modificou a produção de VEGF-A em relação ao BSA ($p>0,05$). A IL-8 (Figura 18B) apresenta um perfil bastante similar de produção, com maior produção pelas HUVEC, mas sem diferenças causadas pela adesão à vitronectina ($p>0,05$). A citocina TGF- β (Figura 18C), ao contrário das demais, apresenta-se elevada na cultura celular de todas as linhagens, mas esta produção também parece independe de adesão ($p>0,05$ para todas as comparações). Os mediadores TNF- α , IL-12 e IL-10 não foram produzidos em quantias detectáveis para nenhuma linhagem celular neste ensaio (dados não mostrados).

Concordando com estes resultados, é sugerido que, após a ligação de células à matriz extracelular, a liberação de VEGF-A pode não ocorrer por células competentes a produzi-lo. Entretanto, pode haver uma ativação de sinalização celular *downstream* ao VEGF, com a ativação da molécula FAK e da via intracelular que seria normalmente ativada pela ligação de VEGF ao seu receptor. Esta via culmina, entre outras funções, com um aumento da expressão de receptores para VEGF. Assim sendo, a ativação da angiogênese não parece ocorrer apenas pela ligação de células à matriz extracelular, mas por esta ligação em conjunto à captação de fatores solúveis já presentes no microambiente (WARY et al., 2012).

Além disso, relatos sugerem que linhagens celulares podem apresentar concentrações crescentes de IL-8 quando as células se aderem à matriz extracelular, principalmente em relação à fibronectina (LOWRIE et al., 2004), e também existem relatos de que macrófagos podem produzir mais mRNA de TNF- α ou IL-8 quando a integrina $\alpha\beta 3$ é estimulada com vitronectina ou anticorpos (ANTONOV et al., 2011),

apesar de que o aumento na quantidade de mRNA citoplasmático não implica necessariamente em aumento na expressão dos mediadores em si. Estes dados da literatura não puderam ser correlacionados com o presente trabalho, nem quando SC ou K562 foram expostas à fibronectina, nem quando HUVEC e os monócitos/macrófagos SC foram expostos à vitronectina.

Por outro lado, é interessante notar a alta produção de TGF- β por estas linhagens celulares. Apesar de não ter havido alteração na produção deste mediador após a adesão celular, o TGF- β é conhecido por ser um indutor da transformação epitelial-mesenquimal, fundamental ao desenvolvimento de metástases no câncer, muitas vezes sendo produzido pela própria célula alvo. Entre suas funções, ele coordena e ativa diversas vias de sinalização implicadas na resistência à *anoikis*, além de induzir migração, invasão e o crescimento independente de ancoragem (KIM et al., 2012). Em parte, esta produção de TGF- β poderia explicar parcialmente a aparente ausência de apoptose após perda de adesão para as células SC e K562, tendo sido notada apenas para as HUVEC frente à desintegrina recombinante DisBa-01 (Item 4.9.2).

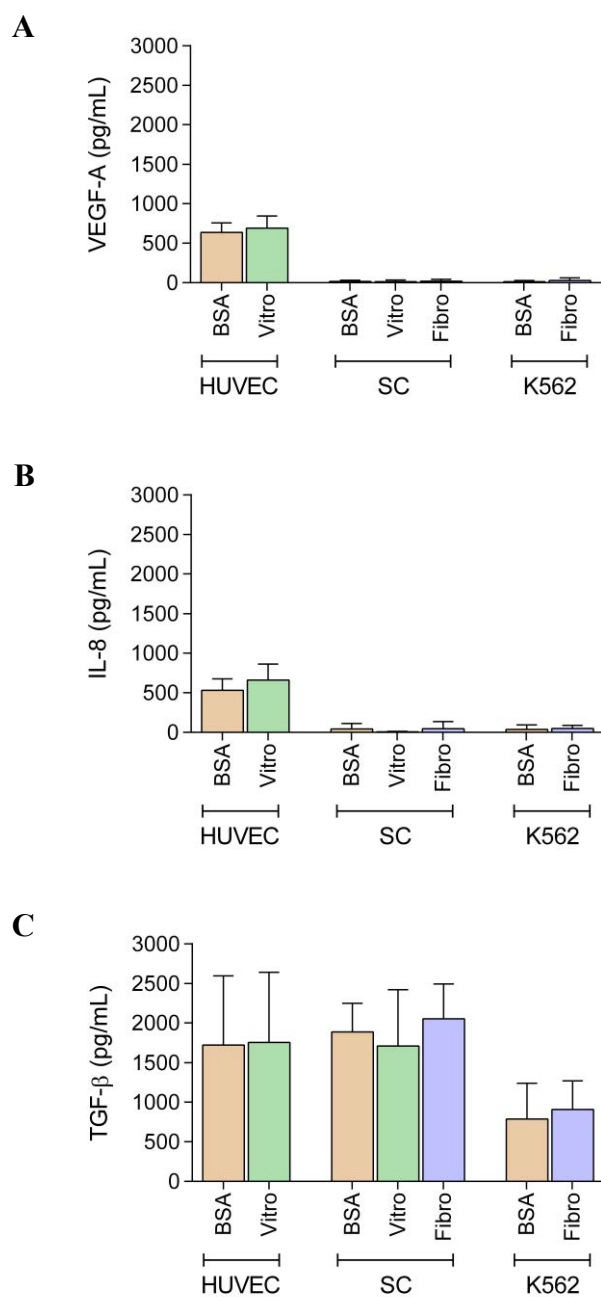


Figura 18. Produção de mediadores celulares após adesão. As células HUVEC, SC e K562 foram deixadas aderir por 24 hrs a BSA (controle), vitronectina (vitro) ou fibronectina (fibro), então VEGF-A, IL-8 e TGF- β foram dosados no sobrenadante de cultura. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: não há diferenças entre os grupos.

4.16. Quantificação de mediadores após exposição à desintegrina

Como observado na Figura 19, a presença de VEGF-A no sobrenadante de cultura da linhagem HUVEC é notável, mesmo na ausência de estímulo (controle, C). Entretanto, a produção deste mediador não se modifica de forma importante frente aos estímulos testados ($p>0,05$ em todas as comparações). Em relação as células SC, observou-se que estas parecem produzir menos VEGF-A espontaneamente em comparação às outras duas linhagens estudadas ($p<0,05$), mas esta produção pode ser elevada frente a estímulos específicos, como o PMA ($p<0,05$) e a desintegrina DisBa-01 livre ($p<0,01$). Este resultado é pouco interessante, pois a produção demasiada de VEGF está relacionada à progressão tumoral, angiogênese, imunossupressão local e formação de metástases (SITOHY et al., 2012). Na Figura 19 também é possível observar que a produção de VEGF-A pelas células K562 ocorre mesmo na ausência de estímulos (controle, C), de forma similar às células HUVEC, e esta produção não foi alterada frente a desintegrina livre ou incorporada em micelas ($p>0,05$), como esperado.

Além da produção de VEGF-A na cultura de monócitos/macrófagos observada aqui, a literatura mostra que DisBa-01 parece ser capaz de elevar a produção deste mediador em cultura de fibroblastos humanos, mesmo quando utilizada em concentrações menores, ainda que ela diminua a quantidade de mRNA para os receptores 1 e 2 de VEGF neste modelo (MONTENEGRO et al., 2012). É interessante mencionar que a integrina $\alpha v \beta 3$ em seu domínio intracelular interage com a cauda dos receptores de VEGF, ampliando ambos os sinais derivados da integrina e do receptor do fator de crescimento, o que termina por gerar uma amplificação de sinais pró-angiogênicos. Esta interação entre os receptores pode ser rompida por TGF- β , mas é estimulada por VEGF-A (NAM et al., 2012). Estes dados por si só já indicam que a ligação da desintegrina DisBa-01 à integrina $\alpha v \beta 3$ leva a diferentes resultados quando

comparada com a ligação da vitronectina a esta integrina. Portanto, dependendo das características que se deseje obter, a desintegrina DisBa-01 poderia ser utilizada para modular as funções de $\alpha v\beta 3$.

É bastante clara a alta produção de IL-8 pelas células HUVEC (Figura 20), apesar de que esta produção se manteve constante em todas as situações analisadas ($p > 0,05$). Por outro lado, a linhagem SC e K562 apresentam quantidades mais baixas de IL-8, o que era esperado tendo em vista a reduzida produção desta citocina em outra situação experimental (Item 4.10). Pode-se notar que as células SC podem ser capazes de aumentar até 4 vezes a quantidade de IL-8 produzida frente ao estímulo ideal, como o PMA ($p < 0,001$ quando comparada ao controle), mas a desintegrina alvo deste estudo não é capaz de modificar esta produção ($p > 0,05$).

A IL-8 é uma citocina relacionada à angiogênese, produzida especialmente por macrófagos e neutrófilos, que, dentre outras funções, é quimiotática para neutrófilos e macrófagos e exacerba a inflamação local. Está usualmente ligada à progressão tumoral e metástase, tendo algumas funções reconhecidas na angiogênese (YANG et al., 2011). Deste modo, o fato da desintegrina livre ou incorporada em micelas não gerar um aumento na produção deste mediador pode ser interessante para um futuro uso quimioterápico.

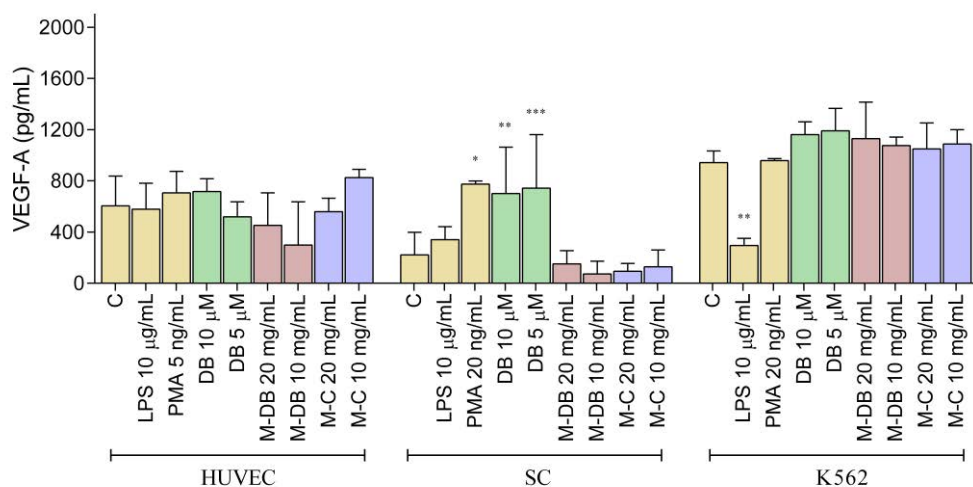


Figura 19. Produção de VEGF-A após exposição a desintegrina recombinante DisBa-01 livre ou incorporada em micelas. C: controle de células expostas apenas ao tampão de adesão; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; PMA: acetato miristato de forbol; DB: desintegrina DisBa-01; M-DB: micela contendo a desintegrina; M-C: micela controle. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

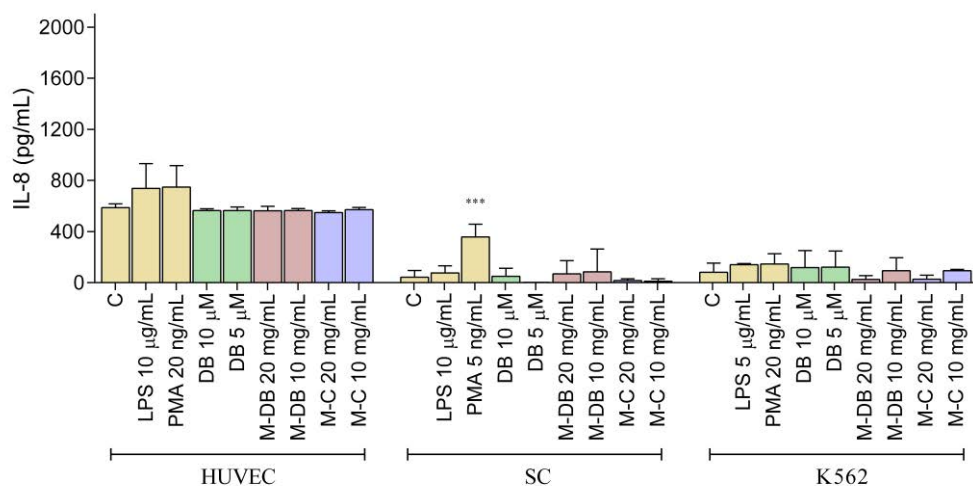


Figura 20. Produção de IL-8 após exposição a desintegrina recombinante DisBa-01 livre ou incorporada em micelas. C: controle de células expostas apenas ao tampão de adesão; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; PMA: acetato miristato de forbol; DB: desintegrina DisBa-01; M-DB: micela contendo a desintegrina; M-C: micela controle. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: *** $p < 0,001$.

As células HUVEC apresentam uma maior produção de TGF- β (Figura 21) quando expostas à desintegrina DisBa-01 livre a 10 μ M ($p<0,05$), e uma produção elevada, ainda que não significativa, frente a desintegrina a 5 μ M ($p>0,05$). As células SC também apresentam uma maior produção frente a M-DB em todas as concentrações testadas ($p<0,05$), mas esta produção pode ou não ter sido influenciada pela desintegrina já que os níveis de TGF- β também estão elevados frente a M-C ($p<0,01$). As células K562 apresentaram uma considerável produção de TGF- β , o que era esperado baseado no teste de produção de mediadores após adesão (Item 4.10), mas esta produção se manteve estável em todos os grupos ($p>0,05$).

Apesar de suas funções de estimular a transformação epitelial-mesenquimal, associada à progressão tumoral e à resistência à *anoikis* (KIM et al., 2012), o TGF- β estimula a proteína transmembrana TGFBIp/big-h3, presente em uma variedade de células humanas, a produzir peptídeos contendo RGD capazes de induzir apoptose, inibir a angiogênese e a migração de células endoteliais que possuam a integrina $\alpha v \beta 3$. Além disto, a proteína TGFBIp/big-h3, quando estimulada por TGF- β , é capaz de interagir diretamente com a cauda citoplasmática da integrina $\alpha v \beta 3$ quando esta se une à cauda do receptor de VEGF 2, impedindo a transdução de sinal, diminuindo a angiogênese e estimulando a adesão celular (NAM et al., 2012). Estas funções paradoxais do TGF- β são finamente reguladas no organismo em situação fisiológica. Entretanto, frente ao desequilíbrio que pode ocorrer na produção deste mediador durante a carcinogênese e a progressão tumoral (KIM et al., 2012), o uso de DisBa-01 deve ser analisado quanto ao seu potencial benefício ou malefício.

As células K562 e SC não apresentaram produção detectável de TNF- α (dados não mostrados), enquanto as células HUVEC (Figura 22) apresentaram uma produção notável frente ao PMA ($p<0,01$), mas não à desintegrina DisBa-01 livre ($p>0,05$). Não

obstante, a produção deste mediador fica significativamente abaixo do controle para M-DB e M-C em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$ para todos os testes comparados ao controle; $p > 0,05$ entre os testes). Correlacionado a isto, ainda que a perda de viabilidade celular para as HUVEC não fosse importante durante as primeiras 24 horas, ela se torna importante após 48 horas quando as células foram expostas a M-DB ou M-C (Item 4.6), sendo possível que isto tenha prejudicado a produção de TNF- α observada para estas preparações mesmo antes de decorridas as 48 horas.

A citocina TNF- α foi identificada e nomeada a partir da sua intrínseca capacidade de estimular necrose em tumores (CARSWELL et al., 1975). Atualmente, entretanto, vários mecanismos pró-tumorais foram identificados, tendo funções conhecidas no crescimento tumoral, invasão e metástase. Estes mecanismos são desencadeados a partir da ativação dos receptores de TNF expressos em células endoteliais (TNF-R1) e em células imunes (TNF-R2), tendo sido observado um maior desenvolvimento tumoral devido a ativação de TNF-R1 do que de TNF-R2 (BAAY et al., 2011). A produção constitutiva de TNF- α no microambiente tumoral é uma característica encontrada em muitos cânceres, derivada de diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais, fibroblastos e células imunes infiltradas, além das próprias células tumorais. Esta citocina aumenta a migração e a metástase através da ativação do fator de transcrição NF- κ B, e sua presença na região tumoral está correlacionada a um pior prognóstico (HAO et al., 2012). Devido as suas características predominantemente pró-tumorais, é interessante que a DisBa-01 não provoque a produção deste mediador, principalmente nas células endoteliais HUVEC e nas células monocíticas/macrofágicas SC.

A angiogênese é um processo multifatorial e está intimamente relacionado ao crescimento tumoral e a formação de metástases, mas, por outro lado, ela está reduzida

em outras patologias, como na falha de cicatrização associada ao diabetes. Os mediadores produzidos por células sob estresse ajudam a iniciar um processo inflamatório e a modificar os tecidos, expandindo os capilares sanguíneos (WEISS & CHERESH, 2011; LOKMIC et al., 2012).

Células inflamatórias, endoteliais e tumorais podem modular a angiogênese através de sua capacidade de produzir mediadores solúveis. Dentre estes, VEGF-A, IL-8, TGF- β e TNF- α apresentam papéis às vezes controversos neste cenário complexo. Enquanto o TGF- β é capaz de estimular os macrófagos para um perfil M2, que estimula a angiogênese, e capaz de modificar a matriz extracelular, o VEGF-A aumenta a proliferação das células endoteliais e também atua no remodelamento da matriz. Como uma regulação positiva, o TGF- β leva ao aumento da produção de VEGF-A (BARRIENTOS et al., 2008; MIYAZONO et al., 2012).

O TNF- α surge neste ambiente sendo produzido pelos macrófagos e pelas células tumorais, principalmente. Em baixos níveis, esta citocina provoca a cicatrização indiretamente, ao estimular a produção de VEGF-A, e atua estimulando a capacidade invasiva de células tumorais. Entretanto, em níveis mais altos, ele é capaz de inibir a síntese de matriz extracelular e aumentar a sua degradação, podendo ter um impacto negativo na angiogênese e no crescimento tumoral (BARRIENTOS et al., 2008; GERMANO et al., 2008).

Foi observado aqui que a desintegrina DisBa-01 parece modificar a produção de mediadores, atuando mais fortemente em células endoteliais como a HUVEC, sendo provavelmente capaz de modular a angiogênese tecidual em um ambiente já desequilibrado, como no caso do câncer. Caso venha ser utilizada como um tratamento quimioterápico adjuvante, pelas suas conhecidas características de reduzir a adesão celular (RAMOS et al., 2008) e diminuir a produção de mRNA para os receptores 1 e 2

de VEGF (MONTENEGRO et al., 2012), os riscos potenciais para cada paciente devem ser avaliados individualmente.

Não obstante, até o momento, as células K562 não demonstraram resposta significativa à desintegrina DisBa-01, nem produzindo mediadores, nem em relação à viabilidade celular, *anoikis* ou perda de adesão. Este dado pode reafirmar a especificidade da DisBa-01 em afetar apenas células que expressam a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$, o que seria interessante para um futuro uso clínico.

As citocinas IL-10 e IL-12, por sua vez, são consideradas parte do suporte onde se constrói e identifica uma resposta imune derivada de macrófagos. A IL-12 em geral se correlaciona a uma imunidade celular, aguda, “efetiva”, produzida pelos antigamente denominados macrófagos classicamente ativados, mais conhecidos atualmente como M1; enquanto a IL-10 está associada a imunidade mais crônica, de reparo tecidual e até imunossupressão, produzida pelos macrófagos alternativamente ativados, os M2 (HAO et al., 2012). Por suas características típicas, estas citocinas foram escolhidas para se observar se haveria uma ativação das células SC, e qual seria esta ativação. No presente estudo, as células SC apresentaram uma produção virtualmente nula destes mediadores (dados não mostrados), tanto frente a todos os compostos testados, inclusive LPS e PMA, quanto frente a adesão celular a vitronectina ou fibronectina (Item 4.10). Até o momento, não sabemos se tais células são capazes de produzir IL-10 ou IL-12, ainda que sejam reconhecidamente capazes de liberar IL-6 e IL-1 β quando estimuladas com endotoxinas ou com IFN- γ (YAMAMOTO et al., 2007).

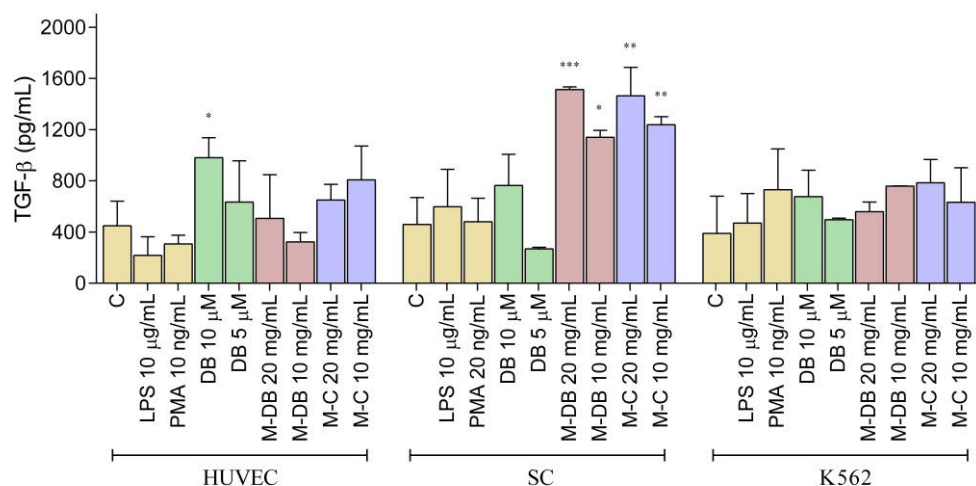


Figura 21. Produção de TGF- β após exposição a desintegrina recombinante DisBa-01 livre ou incorporada em micelas. C: controle de células expostas apenas ao tampão de adesão; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; PMA: acetato miristato de forbol; DB: desintegrina DisBa-01; M-DB: micela contendo a desintegrina; M-C: micela controle. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

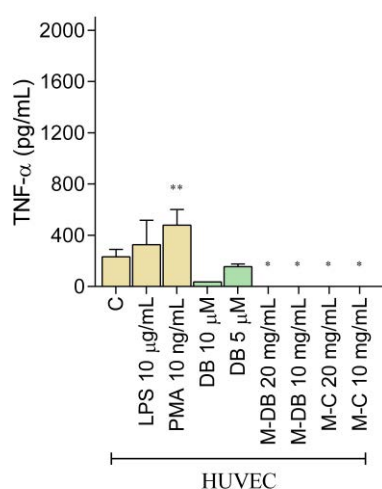


Figura 22. Produção de TNF- α após exposição a desintegrina recombinante DisBa-01 livre ou incorporada em micelas. C: controle de células expostas apenas ao tampão de adesão; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; PMA: acetato miristato de forbol; DB: desintegrina DisBa-01; M-DB: micela contendo a desintegrina; M-C: micela controle. One-way ANOVA e teste Tukey-Kramer: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

As células HUVEC e K562 não apresentaram produção destes mediadores sob nenhum estímulo testado, nem diante de LPS ou PMA em diversas concentrações, sendo que estas linhagens podem não ser capazes de produzi-los. Este resultado era esperado para a linhagem HUVEC, devido à sua origem endotelial, mas havia dúvida quanto ao resultado para a linhagem K562, por ter origem leucêmica, ainda que bastante indiferenciada. É relatado desde 1998, pelo menos, que as células HUVEC não parecem ser capazes de produzir o RNA mensageiro para a IL-12 espontaneamente nem sob estímulos específicos (NILSEN et al., 1998), mas não parecem haver relatos sobre a IL-10 nesta linhagem. Entretanto, para a linhagem K562, há evidência de que estas células são capazes de expressar o mRNA da IL-10 após entrar em contato com IFN- γ (SHNYREVA et al., 2010), apesar de não termos detectado nenhuma produção deste mediador nem mesmo frente ao PMA. Não parece haver relato sobre a produção de IL-12 por células K562.

Apesar de não ter sido observada aqui, uma produção de IL-12 poderia ser benéfica ao hospedeiro portador de tumor maligno. É conhecido que a IL-12 desempenha um papel importante na resposta anticâncer ao facilitar o desenvolvimento de uma resposta imune citotóxica promissora e por atuar promovendo diretamente a destruição de células tumorais *in vitro* e *in vivo*. Além disto, esta citocina apresenta uma interessante atividade antiangiogênica (YUZHALLIN & KUTIKHIN, 2012).

A IL-10 é uma molécula produzida principalmente por macrófagos e linfócitos, e expressa propriedades anti-inflamatórias e funções imunossupressoras, podendo agir desta forma estimulando o crescimento tumoral. Apesar disto, a IL-10 parece ser capaz de modular a apoptose e suprimir a angiogênese. Apesar de seu efeito dubio, esta citocina é encontrada em maiores concentrações em neoplasias mais avançadas (GERMANO et al., 2008; NAUNDORF et al., 2009). Sendo assim, é particularmente

favorável que nenhuma das linhagens estudadas produza esta citocina nas condições que foram analisadas.

Ao longo do último século, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial, digno de grandes esforços científicos para tratá-lo. Entretanto, enquanto somos capazes de perceber a angiogênese ou a metástase como problemas a serem combatidos, não conseguimos facilmente visualizar o quadro de perto e observar cada célula realmente participante do processo, com seus papéis dúbios e desempenho irregular. Menos ainda, não conseguimos captar com nosso conhecimento limitado cada molécula fundamental para a construção deste grande sistema, cada uma delas, desde um pequeno RNA de interferência até uma integrina dimérica na membrana, pode estar atuando de forma positiva ou negativa no crescimento tumoral. Acreditamos nos possíveis benefícios que a desintegrina DisBa-01 trará por gerar forte inibição de adesão e, possivelmente, *anoikis*, podendo vir a reduzir a formação de metástases. Por outro lado, está além do alcance deste trabalho pesar os possíveis malefícios, que poderão ser causados pela alteração na produção de mediadores e, talvez, incentivo à angiogênese, os quais provavelmente variarão conforme o tipo de tumor e o organismo de cada indivíduo.



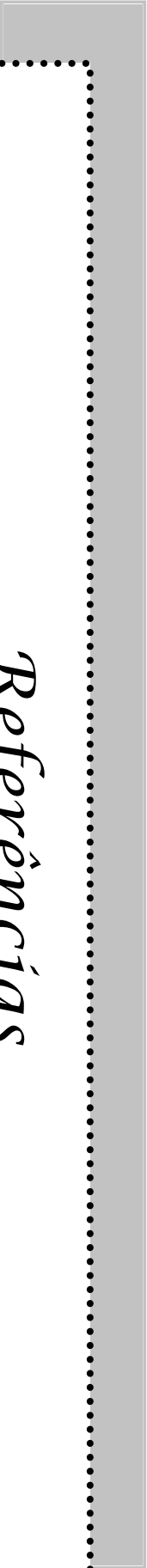
Conclusões

5. CONCLUSÕES

As micelas foram constituídas e caracterizadas. A desintegrina DisBa-01 internalizada não apresentou alterações conformacionais notáveis. As características físicas e químicas das micelas indicam que elas seriam possivelmente biocompatíveis e passíveis de apresentar uma boa biodistribuição.

A citotoxicidade celular causada pela desintegrina livre foi mais notável apenas para células HUVEC e apenas após 48 horas de exposição. Entretanto, a desintegrina gera uma importante inibição de adesão para HUVEC frente à vitronectina. Não obstante, DisBa-01 livre também induz à produção de VEGF-A pelas células SC e de TGF- β pelas células HUVEC.

As células HUVEC foram mais responsivas ao tratamento com DisBa-01, indicando a especificidade de atuação da desintegrina em relação a células contendo níveis altos de integrina $\alpha v \beta 3$. Além disso, a integrina $\alpha v \beta 3$ presente nas células responde diferentemente quando estimulada por vitronectina ou por DisBa-01, de modo que a desintegrina poderia vir a ser utilizada futuramente para modular as funções da integrina.



Referências

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen TM; Cullis PR (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(1):36-48. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037.

Antonov AS; Antonova GN; Munn DH; Mivechi N; Lucas R; Catravas JD; Verin AD (2011). $\alpha V\beta 3$ integrin regulates macrophage inflammatory responses via PI3 kinase/Akt-dependent NF- κ B activation. *J Cell Physiol*, 226(2), 469-476. doi:10.1002/jcp.22356.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2010). Farmacopeia Brasileira, 5a edição. Brasília. Disponível em: www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia

Avraamides CJ; Garmy-Susini B; Varner JA (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 8(8):604-617. doi:10.1038/nrc2353.

Baay M; Brouwer A; Pauwels P; Peeters M; Lardon F (2011). Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clinical and Developmental Immunology*, v2011. doi:10.1155/2011/565187.

Barrientos S; Stojadinovic O; Golinko MS; Brem H; Tomic-Canic M (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep Reg*, 16, 585-601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x

Beija M; Salvayre R; Lauth-de-Viguerie N; Marty JD (2012). Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. *Trends in Biotechnology*, 30:9.

Berraondo P; Prietro J; Gonzales-Asequinolaza G (2009). Advances in interleukin-12 gene therapy for acquired liver diseases. *Current Gene Therapy*, 10:62-71.

Berti D; Caminatiab G; Baglioni P (2011). Functional liposomes and supported lipid bilayers: towards the complexity of biological archetypes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* s/v. doi: 10.1039/c0cp02400g.

Buchheit CL; Rayavarapu RR; Schafer ZT (2012). The regulation of cancer cell death and metabolism by extracellular matrix attachment. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23:402-411.

Bunjes H (2010). Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. *JPP*, 62: 1637-1645.

Burnet FM (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, 13:1-27.

Carswell EA; Old LJ; Kassel RL; Green S; Fiore N; Williamson B (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 72(9):3666-3670.

Chiodoni C; Colombo MP; Sangaletti S (2010). Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Ver*, 29:295-307.

Croci DO; Fluck MFZ; Rico MJ; Matar P; Rabinovich GA; Scharovsky OG (2007). Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*, 56:1687-1700.

Culig Z (2011). Cytokine disbalance in common human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813:308-314.

Desgrosellier JS; Cheresch DA (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews: Cancer*, 10:9-22.

Domingues MM; Santiago OS; Castanho MARB; Santos NC (2008). What can light scattering spectroscopy do for membrane-active peptide studies? *J. Pept. Sci.*, 14:394-400.

Ehrlich PU (1909). Ber den jetztigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskde*, 5:273-290.

Fox JW; Serrano SMT (2005). Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 45:969-985.

Freshney RI (2005). *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Wiley-Liss, 672 p.

Fryer HJ; Davis GE; Manthorpe M; Varon S (1986). Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. *Analytical Biochemistry*, 153:262-266.

Gentilucci L; Cardillo G; Spampinato S; Tolomelli A; Squassabia F; Marco R; Bedini A; Baiula M; Belvisi L; Civera M (2010). Antiangiogenic effect of dual/selective $\alpha 5 \beta 1 / \alpha v \beta 3$ integrin antagonists designed on partially modified retro-inverso cyclotetrapeptide mimetics. *J. Med. Chem.*, 53:106-118. doi:10.1021/jm9013532.

Germano G; Allavena P; Mantovani A (2008). Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine*, 43:374-379.

Gonçalves DFC (2008). Minimização da estrutura da DisBa-01, uma desintegrina com potenciais atividades anti-trombótica e anti-metastática. São Carlos, SP, Brasil. Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, USP.

González-Rodríguez ML; Rabasco AM (2011). Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(7):857-871. doi:10.1517/17425247.2011.574610.

Guinier A (1964), Dunod (ed) *Théorie et Technique de la Radiocristallographie*, Paris, France, Chapter 1.

Hanahan D; Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144:646-674.

Hao NB; Lü MH; Fan YH; Cao YL; Zhang ZR; Yang SM (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*, 2012:948098.

Hynes RO; Naba A (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, s/p. doi: 10.1101/cshperspect.a004903

Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2011. Versão online disponível em www.inca.gov.br.

Janik ME; Przybyło M; Pocheć E; Pokrywka M; Lityńska A (2010). Effect of $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrin glycosylation on interaction of melanoma cells with vitronectin. ABP, 57(1877).

Jarvinen M; Ylänne J; Virtanen I (1993). The effect of differentiation inducers on the integrin expression of K562 erythroleukemia cells. Cell Biology International, 17(4):399-407.

Kauskot A; Cominetti MR; Ramos OHP; Bechyne I; Renard JM; Hoylaerts MF; Crepin M; Legrand C; Selistre-de-Araújo HS; Bonnefoy A (2008). Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. Front Biosci, 13:6604-6616.

Khosravinia H; Manafi M; Alavi R (2011). Effects of polysorbate-80 on liver and kidney function in broiler chicken during juvenile growth period. International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research, 2(10):179-184.

Kim YN; Koo KH; Sung JY; Yun UJ; Kim H (2012). Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. International Journal of Cell Biology, v2012.

Koga K; Ohyashiki T; Murakami M; Kawashima S (2000). Modification of ceftibuten transport by the addition of non-ionic surfactants. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 49:17-25.

Konstantopoulos K; Thomas SN (2009). Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells. Annu Rev Biomed Eng, 11:177-202.

Kroemer G; Galluzzi L; Vandenabeele P; et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ, 16:3-11.

Labhasetwar V; Mohan MS; Dorle AK (1994). A study on zeta potential and dielectric constant of liposomes. *Journal of Microencapsulation*, 11(6):663-668. doi:10.3109/02652049409051117.

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

Lakowicz JR; Thompson RB (1983). Differential polarized phase fluorometric studies of phospholipid bilayers under high hydrostatic pressure. *Biochim Biophys Acta*, 732(2):359-371.

Lokmic Z; Musyoka J; Hewitson TD; Darby IA (2012). Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis. *Int Rev Cell Mol Biol*, 296:139-185.

Löster K; Horstkorte R (2000). Enzymatic quantification of cell-cell and cell-matrix adhesion: peroxidase as a cellular label. *Micron.*, 31:41-53.

Lowrie AG; Salter DM; Ross JA (2004). Latent effects of fibronectin, $\alpha 5 \beta 1$ integrin, $\alpha v \beta 5$ integrin and the cytoskeleton regulate pancreatic carcinoma cell IL-8 secretion. *British Journal of Cancer*, 91:1327-1334.

Lowry OH; Rosebrough NJ; Farr AL; Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.

Malam Y; Loizidou M; Seifalian AM (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(11):592-599.

Mäler L; Gräslund A (2009). Artificial membrane models for the study of macromolecular delivery. *Methods in Molecular Biology*, 480:129-139.

Margadant C; Monsuur HN; Norman JC; Sonnenberg A (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Current Opinion in Cell Biology*, 23:607–614.

Miyazono K; Ehata S; Koinuma D (2012). Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 117:143-152.

Montenegro CF; Salla-Pontes CL; Ribeiro JU; Machado AZ; Ramos RF; Figueiredo CC; Morandi V; Selistre-de-Araújo HS (2012). Blocking $\alpha v \beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie*, 94:1812-1820.

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

Myers P (2006). The cosmetic use of phosphatidylcholine in the treatment of localized fat deposits. *Cosmetic Dermatology*, 19:6.

Nam JO; Son HN; Jun E; Cha K; Lee BH; Park RW; Kim IS (2012). fas1 domain protein inhibits VEGF165-induced angiogenesis by targeting the interaction between VEGFR-2 and $\alpha v \beta 3$ integrin. *Mol Cancer Res*, 10:1010-1020.

Narang AS; Delmarre D; Gao D (2007). Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 345:9-25.

Naundorf S; Schroder M; Hoflich C; Suman N; Volk HD; Grutz G (2009). IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. *Eur J Immunol*, 39(4):1066-1077.

Niederquell A; Kuentz M (2013). Proposal of stability categories for nano-dispersions obtained from pharmaceutical self-emulsifying formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 446:70-80.

Nilsen EM; Johansen FE; Jahnsen FL; Lundin KEA; Scholz T; Brandtzaeg P; Haraldsen G (1998). Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut*, 42:635-642.

Okayama H (2012). Cell cycle control by anchorage signaling. *Cellular Signaling*, 24:1599-1609.

Pedretti ACE (2009). 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.

Petsch D; Anspach FB (2000). Endotoxin removal from protein solutions. J Biotechnol, 21;76(2-3):97-119.

Phutikanit N; Sangkrachang E; Suwimonteerabutr J; Singlor J (2011). Effect of sources and concentrations of soybean phosphatidylcholine on diluted goat semen equilibrated at 4°C. Journal of Agricultural Science and Technology, A1:1170-1173.

Ramos OH; Kauskot A; Cominetti MR; Bechyne I; Pontes CLS; Chareyre F; et al. (2008). A novel alpha(v)beta(3)-blocking disintegrin containing RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. Clin Exp Metastasis, 25:53-64.

Rieger AM; Hall BE; Luong LT; Schang LM; Barreda DR (2010). Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. Journal of Immunological Methods, 358:81-92.

Shnyreva AV; Song W; Van Griensven LJLD (2010). Extracts of medicinal mushrooms *Agaricus bisporus* and *Phellinus linteus* induce proapoptotic effects in the human leukemia cell line K562. International Journal of Medicinal Mushrooms, 12(2):167-175.

Simões SI; Tapadas JM; Marques CM; Cruz MEM; Martins MBF; Cevcb AG (2005). Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 26:307-317.

Sitohy B; Nagy JA; Dvorak HF (2012). Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target. Cancer Res, 15(72):1909. doi: 10.1158/0008-5472.

Spernath A; Aserin A; Sintov AC; Garti N (2008). Phosphatidylcholine embedded micellar systems: enhanced permeability through rat skin. Journal of Colloid and Interface Science, 318:421-429.

Sreerama N; Venyaminov YS; Woody RW (2001). Analysis of protein circular dichroism spectra based on tertiary structure classification. Analytical Biochemistry, 299:271-274.

Sun W; Xie C; Wang H; Hu Y (2004). Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. *Biomaterials*, 25:3065-3071.

Taddei ML; Giannoni E; Fiaschi T; Chiarugi P (2011). Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of Pathology*. doi: 10.1002/path.3000.

Teklemariam T; Seoane AI; Ramos CJ; Sanchez EE; Lucena SE; Perez JC; Mandal SA; Soto JG (2011). 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.

Tran MA; Watts RJ; Robertson GP (2009). Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 22(4):388-399.

Ullrich E; Bonmort M; Mignot G; Kroemer G; Zitvogel L (2008). Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. *Cell Death and Differentiation*, 15:21-28.

Vachon PH (2011). Integrin signaling, cell survival, and anoikis: distinctions, differences, and differentiation. *Journal of Signal Transduction*, v2011.

Wang W; Wang YJ; Wang DQ (2008). Dual effects of Tween 80 on protein stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 347:31-38.

Wary KK; Kohler EE; Chatterjee I (2012). Focal adhesion kinase regulation of neovascularization. *Microvascular Research*, 83(1):64-70.

Weiss SM; Cheresch DA (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine*, 17(11):1359-1370. doi:10.1038/nm.2537.

Wlodkowic D; Telford W; Skommer J; Darzynkiewicz Z (2011). Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Cell Biol. Methods*, 103: 55-98.

Yamamoto A; Ochiai M; Kamachi K; Kataoka M; Toyoizumi H; Arakawa Y; Horiuchi Y (2007). 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(Special Issue), 647-653.

Yang SY; Miah A; Pabari A; Winslet M (2011). Growth factors and their receptors in cancer metastases. *Front Biosci*, 1(16):531-538.

Yuzhalin AE; Kutikhin AG (2012). Interleukin-12: clinical usage and molecular markers of cancer susceptibility. *Growth Factors*, 30(3):176-91.

Zhang Q; Lee I; Joo JB; Zaera F; Yin Y (2013). Core-shell nanostructured catalysts. *Acc Chem Res*, 20;46(8):1816-24. doi: 10.1021/ar300230s.