

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA E FARMACOLOGIA

DALTON DITZ JÚNIOR

Participação da proteinase CMS2MS3
na atividade antimetastática de fração do látex de
Vasconcellea cundinamarcensis:
efeitos sobre a adesão e morte celular

Belo Horizonte
2015

DALTON DITZ JÚNIOR

Participação da proteinase CMS2MS3
na atividade antimetastática de fração do látex de
Vasconcellea cundinamarcensis:
efeitos sobre a adesão e morte celular

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Miriam T. P. Lopes

Belo Horizonte
2015

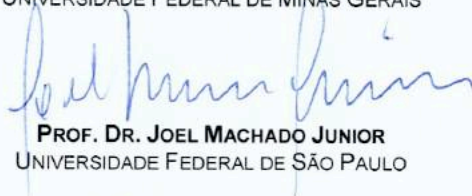
**"PARTICIPAÇÃO DA PROTEINASE CMS2MS3 NA ATIVIDADE
ANTIMETASTÁTICA DE FRAÇÃO DO LÁTEX DE
VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS: EFEITOS SOBRE A
ADESÃO E MORTE CELULAR"**

DALTON DITZ JUNIOR

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 07 de julho de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. DAWIDSON ASSIS GOMES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. JOEL MACHADO JUNIOR
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO



PROFA. DRª. LUCÍOLA DA SILVA BARCELOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. TÂNIA BEATRIZ CRECZYNSKI PASA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA



PROFA. DRª. MIRIAM TERESA PAZ LOPES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 07 de julho de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente,

à Deus.

à minha orientadora, Miriam, que se tornou, para mim, um exemplo de dedicação, seriedade e compromisso com a ciência. Obrigado por tornar possível a realização desse trabalho, pelos ensinamentos, amizade e paciência nesses nove (9!!!) anos de convivência.

aos contribuintes brasileiros e às agências de fomento (CNPq, CAPES e FAPEMIG).

à Lu, “chefe do laboratório”, motivadora, carinhosa e essencial na vida de todos do LSAT. Obrigado por encontrar tudo o que estava “muito bem guardado” e por aposentar somente depois da minha defesa!

à Gabi, que tomou como seu esse trabalho, obrigado pela presteza, disponibilidade e companheirismo.

à Erika Alvarenga, pela colaboração, sugestões, disponibilidade e atenção com esse trabalho.

ao Prof. Salas, pela colaboração e sugestões.

aos antigos e atuais, mas sempre amigos, do LSAT, especialmente Ana, Ariadne, Celso, Cinthia, Fernanda Duarte, Fernanda Lemos, Heveline, Imaculada, Kátia, Lívia, Luciana, Sandra, Verlane. Todas as críticas, sugestões e mutirões para os experimentos fizeram com que esse trabalho pudesse existir. A amizade de vocês tornou mais prazerosos os dias de trabalho e foi responsável por me animar nos momentos de dificuldade. Agradeço, ainda, por essa amizade transpor os limites do laboratório e ocupar um espaço especial em minha vida.

à minha mãe, Ana, pelo incentivo, apoio e amor dedicados a mim, sempre, tornando mais fácil e seguro o meu crescimento.

às minhas irmãs, Erika e Elysângela, por quem sinto profundo orgulho e admiração. Obrigado pelo incentivo, opiniões, atenção e cuidado tão presentes em todos os momentos da minha vida.

ao Ednaldo, Inácio e Itacy, pelo apoio, e aos meus sobrinhos Bernardo, Henrique e Isadora, pela alegria e vitalidade inspiradoras, tão própria da idade.

aos meus amigos, Bela, Daniel, Igor, Lorena, Milene C., Milene S., Rafael e Ramon que, ao longo desses anos, estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, proporcionando inúmeros momentos de diversão, pela amizade e lealdade.

aos colegas do CEPAPAG, Fábio e Marco Túlio.

aos professores e colaboradores Elaine Souza-Fagundes, Maria de Fátima Leite e Ricardo Fujiwara, pelas colaborações, sugestões e ensinamentos.

aos professores André Klein e Janetti Francischi por permitir a utilização do seu laboratório (Inflamação e Dor) em dias de experimento.

aos vizinhos e amigos do Lab. de Inflamação e Dor, Ayslan e Natália, pelas conversas, congressos, e trocas de experiência.

aos demais colegas dos Laboratórios de Angiogênese, de Inflamação e Dor, de Sinalização de Cálcio (LabCalcio) e de Imunologia e Genômica de Parasitos.

e a todos que, de alguma forma, participaram desse trabalho.

RESUMO

DITZ, D. **Participação da proteinase CMS2MS3 na atividade antimetastática de fração do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*: efeitos sobre a adesão e morte celular**. 2015. 122 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que frações proteolíticas de látex *Vasconcellea cundinamarcensis* (P1G10 e CMS2) têm atividade antitumoral e antimetastática em melanoma murino com redução da adesão e migração celular e indução de apoptose. Quando CMS2 é submetida à cromatografia em resina Mono-S Sepharose (FPLC), cinco proteases (CMS2MS1-5) são isoladas. Nosso objetivo foi identificar a(s) protease(s) presentes nas frações menos purificadas, e avaliar a atividade na adesão e morte celular que contribuem para os efeitos previamente descritos na linhagem celular de melanoma murino metastático (B16F10). Dentre as cinco proteases analisadas, CMS2MS3 mostrou a menor CC-50 (7,81 µg/mL) em comparação com as demais (34,5 - 303,5 µg/mL). Todas as proteases, especialmente CMS2MS3 (10 - 50 µg/mL), reduziram a adesão de B16F10 à placas de poliestireno. CMS2MS3 também promoveu uma redução na adesão de células B16F10 aos componentes da matriz extracelular, especialmente vitronectina e laminina, após o tratamento com 10 µg/mL por 2, 4, 8 ou 24 h. O nível das subunidades α_4 , α_5 e β_1 de integrina foi reduzido por CMS2MS3 10 µg/mL em todos os tempos analisados, mostrando que este efeito contribui, pelo menos parcialmente, para a perda da adesão. A quantidade de vinculina/célula reduziu em 65-85% a partir de 2h de exposição à CMS2MS3, mostrando que a adesão focal pode estar ligada às integrinas composta pelas subunidades α_4 , α_5 ou β_1 . Após 2 - 24h de exposição à CMS2MS3, a quantidade de DNA sub-diplóide aumentou apenas para a concentração de 50 µg/mL, embora, na concentração de 10 µg/mL, já se observa uma redução nos níveis intracelulares de pró-caspases 3 e 9, a partir de 2h de exposição, mostrando que a morte celular ocorre por apoptose e após a perda da adesão. Observou-se, também, um aumento rápido do cálcio nuclear e mitocondrial após a exposição de B16F10 à CMS2MS3 10 µg/mL, o que pode estar relacionado à liberação de citocromo c e ativação da apoptose. Assim, dentre as cinco proteases de CMS2, CMS2MS3 apresentou o melhor efeito citotóxico e capacidade de reduzir a adesão, mediada pelas subunidades α_4 , α_5 e β_1 de integrinas, nas células B16F10. A morte celular, por apoptose, ocorre após a perda de adesão e, associado a este último efeito, contribui para reduzir a capacidade de colonização pulmonar.

Palavras-chave: *Vasconcellea cundinamarcensis*. Melanoma. Adesão. Integrina. Apoptose.

ABSTRACT

DITZ, D. **Participação da proteinase CMS2MS3 na atividade antimetastática de fração do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*: efeitos sobre a adesão e morte celular**. 2015. 122 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

Our research group has demonstrated that proteolytic fractions P1G10 and CMS2 (derived from P1G10) of *Vasconcellea cundinamarcensis*' latex display antitumor and antimetastatic activity on murine melanoma as demonstrated by reduction in cell adhesion, migration, and induction of apoptosis. The CMS2 was further resolved into five proteases (CMS2MS1-5) when chromatographed on Mono-S Sepharose resin (FPLC). These five proteases were analyzed for their ability to promote cell adhesion changes and death effects seen earlier in less purified fractions, by using a murine metastatic melanoma cell line (B16F10). Among the five analyzed proteases, CMS2MS3 showed the lowest CC-50 (7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared to others (34.5 to 303.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Each protease reduced B16F10 adhesion on polystyrene plates, particularly CMS2MS3 at 10 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This protease also promoted a reduction in the B16F10 cell adhesion to extracellular matrix components, especially towards vitronectin and laminin, after treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 2, 4, 8 or 24 h. The level of α_4 , α_5 and β_1 subunits of integrin was reduced when cells were exposed to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CMS2MS3 at each interval analyzed demonstrating that this effect contributes, at least partially, with the loss of adhesion. The number of vinculin/cell reduced 65 – 85% after 2 h exposure to CMS2MS3, showing that focal adhesion may be linked to that integrin composed of subunits α_4 , α_5 and β_1 . After 2 – 24 h exposure to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CMS2MS3, sub-diploid DNA was increased. However, in lower concentration (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) CMS2MS3 induced a reduction in intracellular levels of pro-caspases 3 and 9 from 2h of exposure of cells, suggesting that cell death ensues apoptosis and loss of cell adhesion. A rapid increase in nuclear and mitochondrial calcium was observed after B16F10 exposure to CMS2MS3 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and this may be related to the release of cytochrome c and activation of apoptosis. Thus, CMS2MS3 showed the strongest cytotoxic effect and the ability to reduce cell adhesion, mediated by α_4 , α_5 and β_1 subunits of integrin in B16F10 cells. The cell death observed is probably by apoptosis, after loss of adhesion and might contributes to impair the ability of tumor lung colonization.

Keywords: *Vasconcellea cundinamarcensis*. Melanoma. Adhesion. Integrin. Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Progressão tumoral.....	20
Figura 2. Adesão focal	22
Figura 3. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose	25
Figura 4. <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	32
Figura 5. Perfil cromatográfico do látex em resina Sephadex G-10.....	67
Figura 6. Perfil eletroforético de diferentes amostras de látex de <i>V. cundinamarcensis</i> e fração P1G10 em gel SDS/PAGE 12% em condições desnaturantes.....	67
Figura 7. Perfil cromatográfico de P1G10 em resina CM Sephadex C-25.....	68
Figura 8. Cromatografia em coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose acoplada ao sistema FPLC.....	69
Figura 9. Perfil eletroforético das proteases obtidas na cromatografia em Mono-S Sepharose.....	70
Figura 10. Adesão de células B16F10 a placas de poliestireno	73
Figura 11. Viabilidade de células do sobrenadante após tratamento com as proteases.....	74
Figura 12. Adesão de B16F10 a diferentes componentes da matriz extracelular.....	75
Figura 13. Alterações morfológicas em células B16F10 tratadas com CMS2MS3...	77
Figura 14. Área absoluta de vinculina na membrana por célula	78
Figura 15. Expressão fenotípica de subunidades de integrina em células B16F10 tratadas com CMS2MS3	78
Figura 16. Perfil da expressão fenotípica de subunidades de integrina em células B16F10 tratadas com CMS2MS3.....	79
Figura 17. Eletroforese de DNA de células B16F10 tratadas com CMS2MS3	80
Figura 18. Fragmentação do DNA de células B16F10 tratadas com CMS2MS3	80
Figura 19. Efeito de CMS2MS3 sobre proteínas indicadoras da via apoptótica	81
Figura 20. Percentual de células apoptóticas.	82

Figura 21. Marcação com Anexina V-FITC e PI em células B16F10 tratadas com CMS2MS3	83
Figura 22. Fluxo de Ca^{2+} nuclear e citoplasmático em células B16F10 expostas à CMS2MS3	84
Figura 23. Fluxo de Ca^{2+} mitocondrial em células B16F10 expostas a CMS2MS3 ..	85
Figura 24. Pulmões colonizados por células B16F10	86
Figura 25. Número de colônias de células B16F10 e peso dos pulmões	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de proteína, proporção e atividade amidásica específica das proteases obtidas após cromatografia em Mono-S Sepharose. 71

Tabela 2 – Determinação da CC-50 das proteases sobre B16F10 e Melan-A 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator de indução de apoptose, do inglês, <i>apoptosis-inducing factor</i>
AKT/PKB	Proteína quinase B, do inglês, <i>protein kinase B</i>
ANOVA	Análise de variância, do inglês, <i>analysis of variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
ATV	Solução de tripsina-versene
BAD	Promotor de morte associado à Bcl-2, do inglês, <i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAK	<i>Killer</i> antagonista de Bcl-2, do inglês, <i>Bcl-2-antagonist/killer</i>
BAPNA	Benzoil-arginil-p-nitro-anilida
BAX	Proteína X associada à Bcl-2, do inglês, <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	Linfoma de células B tipo 2, do inglês, <i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-W	Linfoma de célula B tipo W, do inglês, <i>B-cell lymphoma W</i>
BCL-XL	Extra grande linfoma de célula B, do inglês, <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BID	Domínio BH3 que interage com agonista de morte, do inglês, <i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIK	<i>Killer</i> integrante de Bcl-2, do inglês, <i>BCL2-interacting killer</i>
BIM	Mediador que interage com Bcl-2, do inglês, <i>Bcl-2 interacting mediator</i>
BMF	Fator modificador de Bcl-2, do inglês, <i>Bcl-2 modifying factor</i>
BOK	<i>Killer</i> ovariano associado à BCL-2, do inglês, <i>BCL-2-related ovarian killer</i>
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês, <i>bovine serum albumine</i>
CAD	DNase ativada por caspase-3, do inglês, <i>caspase-3-activated DNase</i>

CAM	Moléculas de adesão celular, do inglês, <i>cell adhesion molecules</i>
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etileno-diamino-tetracetato dissódico
<i>e.g.</i>	Por exemplo, do latim, <i>exempli gratia</i>
EndoG	Endonuclease G
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular, do inglês, <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	e outros, do latim, <i>et alli</i>
FACS	Separação de células ativada por fluorescência, do inglês, <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAK	Quinase de adesão focal, do inglês, <i>focal adhesion kinase</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FPLC	Cromatografia líquida rápida de protein, do inglês, <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do inglês, <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
HIF	Fator heterodimérico induzível pela hipóxia, do inglês, <i>hypoxia-inducible factor</i>
HRP	Horseradish peroxidase
HtrA2	Serino protease 2 da família do Fator A exigente de alta temperatura, do inglês, <i>high-temperature requirement factor A serino protease</i>
IAA	Iodoacetamina
IAP	Proteínas inibidoras da apoptose, do inglês, <i>inhibitor of apoptosis</i>

IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, do inglês, <i>International Agency for Research in Cancer</i>
CC-50	Concentração inibitória para 50% da população analisada
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IGF-I	Fator de crescimento tipo 1 semelhante à insulina, do inglês, <i>insulin-like growth factor 1</i>
IgG	Imunoglobulina
JNK	Quinase N-terminal de c-Jun, do inglês, <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LTCD8+	Linfócitos T CD8 positivo
MAPK	Proteínas quinase ativada por mitógeno, do inglês, <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MEC	Matriz extracelular
MTT	Brometo de 3(4,5-dimetiltiazol2-ila)-2,5-difeniltetrazólio ou sal de tetrazólio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PCD	Morte celular programada, do inglês, <i>programmed cell death</i>
PE	Ficoeritrina, do inglês, <i>phycoerythrin</i>
PI	Iodeto de propídio, do inglês, <i>propidium iodide</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase, do inglês, <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
pOHMB	Para-hidróxi-mercuribenzóido
PVDF	Membrana de fluoreto de polivilideno, do inglês, <i>polyvinylidene difluoride</i> .
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI 1640	Meio do Instituto e Memorial Roswell Park 1640, do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i> .
RTK	Receptores tirosina quinase, do inglês, <i>receptor tyrosine kinase</i> .

SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
Smac/DIABLO	Secundo ativador de caspase derivado da mitocôndria/ Proteína mitocondrial ligante das proteínas inibidoras de apoptose, do inglês, <i>second mitochondria-derived activator of caspase/ IAP-binding mitochondrial protein</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBS	Salina tamponada-Tris, do inglês, <i>Tris-buffered saline</i> .
TEMED	N',N',N',N''-tetrametil-etileno-diamina
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês, <i>tumor necrosis factor</i> .
TNFR	Receptor para o fator de necrose tumoral, do inglês, <i>tumor necrosis factor receptor</i> .
TTBS	Tampão de transferência Towbin com Tween, do inglês, <i>Tween Towbin transfer buffer</i> .
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo
VCAM	Proteína vascular de adesão celular, do inglês, <i>vascular cell adhesion protein</i> .
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i> .

LISTA DE SÍMBOLOS

% (p/v)	percentual peso por volume
% (v/v)	percentual volume por volume
°C	graus celsius ou centígrados
Abs	absorbância
atm	atmosfera (1,01325x10 ⁵ Pascal)
µg	micrograma (10 ⁻⁶ g)
µL	microlitro (10 ⁻⁶ L)
cm	centímetro (10 ⁻² m)
Ctr	controle
Da.	Daltons
D.O.	densidade ótica
g	grama
<i>g</i>	força gravitacional (9,81 m.s ⁻²)
h	hora
<i>i.m.</i>	intramuscular
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravascular
kDa	kilodalton (10 ³ Da.)
kg	kilograma
L	litro
log	logaritmo
M	concentração molar (moles/L)
mA	miliÂmpere
mg	miligrama (10 ⁻³ g)

min	minutos
mL	mililitro (10^{-3} L)
mM	concentração milimolar (10^{-3} moles/L)
mm	milímetro (10^{-3} m)
nm	nanômetro (10^{-9} m)
nM	concentração nanomolar (10^{-9} moles/L)
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
s.c.	subcutâneo
V	Volts
v.o.	via oral
v.s.	versus
W	Watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O CÂNCER.....	17
1.2 MORTE CELULAR	23
1.3 TRATAMENTOS PARA O CÂNCER.....	28
1.4 PROTEASES DO LÁTEX DE <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIMETASTÁTICA	31
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAIS	38
4.1.1 Biológicos	38
4.1.2 Reagentes e solventes	38
4.1.3 Soluções	40
4.1.4 Kits.....	45
4.1.5 Equipamentos.....	45
4.1.6 Diversos.....	47
4.2 MÉTODOS.....	49
4.2.1 Obtenção de frações, sub-frações e proteinases do látex de <i>V. cundinamarcensis</i>	49
4.2.2 Ensaio Biológicos	55
5 RESULTADOS	66
5.1 OBTEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEOLÍTICAS DO LÁTEX DE <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	66
5.1.1 Obtenção da fração P1G10	66
5.1.2 Obtenção das sub-frações, CMS1 e CMS2, de P1G10.....	68
5.1.3 Obtenção das frações CMS2MS1 a CMS2MS5	69
5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	71
5.2.1 Efeito das proteases sobre a viabilidade celular.....	71
5.2.2 Efeito das proteases sobre a adesão celular	72
5.2.3 Efeito da protease sobre a fragmentação do DNA	79
5.2.4 Efeito de CMS2MS3 sobre a apoptose.....	81
5.2.5 Fluxo de Ca^{2+} em células B16F10 tratadas com CMS2MS3	83
5.2.6 Indução de metástases pulmonares após tratamento de células B16F10 com CMS2MS3	86

6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÃO.....	104
8 PERSPECTIVAS.....	105
9 REFERÊNCIAS.....	106
APÊNDICE	121

1 INTRODUÇÃO

As mudanças no perfil demográfico, consequência, entre outros fatores, do processo de urbanização populacional, da industrialização e dos avanços da ciência e da tecnologia, têm trazido novos estilos de vida e exposição a fatores de risco próprios do mundo contemporâneo. Esse processo, associado à transformação nas relações entre as pessoas e seu ambiente, trouxe uma alteração importante no perfil de morbimortalidade, diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e colocando as doenças crônico-degenerativas, como o câncer, no centro de atenção dos problemas de doença e morte da população mundial (Vineis e Wild, 2014).

1.1 O CÂNCER

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. No Brasil, a estimativa para o ano de 2015 aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (Inca, 2014).

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, invadindo tecidos e órgãos, podendo se espalhar (metástase) para outras regiões do corpo. As altas taxas de morbidade se devem à falta de terapias que sejam efetivas nos estágios avançados da doença, especialmente, em tumores com alta capacidade de metastatização. Além disso, o diagnóstico nas fases iniciais da doença é difícil, visto que o padrão ouro para o

diagnóstico definitivo continua sendo, em muitos casos, a biópsia com análise histológica, uma técnica invasiva, e que acaba sendo executada em fases tardias (Gadeliya Goodson e Grossman, 2009).

A carcinogênese, definida como o processo de formação do câncer, geralmente acontece de forma lenta, podendo levar anos para que uma célula cancerosa origine um tumor clinicamente detectável (Cassidny *et al.*, 2010). Diferentemente de tumores pediátricos, os quais, usualmente, se desenvolvem a partir de translocações cromossômicas específicas, os cânceres que são mais comuns próximos aos 40 anos de idade exibem extrema instabilidade cromossômica nas células que não possuem mecanismos de reparo adequado (Yoshioka *et al.*, 2015).

Existem inúmeros mecanismos envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula maligna, a grande maioria, interferindo na divisão celular (Almeida *et al.*, 2005). As alterações genéticas, herdadas ou induzidas (promovidas por agentes carcinógenos), se mantêm e são transmitidas da célula alterada às suas células filhas. Essas alterações se constituem de eventos como a inativação de genes supressores tumorais (*e.g.*: p53 ou Rb) ou ativação de proto-oncogenes (*e.g.*: Ras ou Myc) que afetam o mecanismo de controle da divisão celular (Shortt e Johnstone, 2012; Yoshioka *et al.*, 2015). Microscopicamente, as células tumorais apresentam algumas características que as distinguem das normais como: alta proporção do núcleo em relação ao citoplasma, nucléolo proeminente, mitocôndria com menor funcionalidade, alterações no citoesqueleto e poucas estruturas especializadas (Alonso *et al.*, 2004).

Em células normais, o estímulo para a proliferação começa com a liberação de fatores de crescimento, os quais se ligam aos receptores na membrana das células e desencadeiam a liberação de fatores de transcrição, impulsionando a célula pelo ciclo celular. As células que irão replicar se movem da fase G0 (célula em repouso) para a fase G1, na qual ocorre o crescimento celular e inicia a síntese de RNA e proteínas. Para as células normais, o balanço entre sinais proliferativos e de inibição da proliferação, em G1, irá determinar se o ciclo vai progredir para a fase S, onde se inicia a replicação ou síntese de DNA, resultando na duplicação deste ácido nucleico. A fase S é seguida por G2, onde as células se preparam para entrar em mitose (M) e se dividir em duas células idênticas (Foster, 2008; Nath *et al.*, 2015). Qualquer dano no DNA e/ou mau funcionamento de organelas e estruturas

essenciais para o ciclo celular ocasionam o atraso ou parada deste ciclo, para que o defeito possa ser reparado, caso contrário, a célula entraria em processo de morte (Weinberg e Lundberg, 1999; Assunção Guimarães e Linden, 2004).

Uma vez que as células tumorais perdem o controle da divisão celular, estas vão se multiplicando e formam uma massa tumoral. A ideia em vigor é de que o tumor seja constituído não só por células transformadas, mas também por outras do hospedeiro como as células endoteliais, musculares lisas, fibroblastos e as células do sistema imune, que interagem entre si. Essa formação, denominada de microambiente tumoral, é determinante para o processo de progressão do tumor (Hanahan e Weinberg, 2000; Nath *et al.*, 2015).

Com a expansão, ocorre o aumento da distância de difusão do oxigênio e de nutrientes para determinadas áreas do tumor. Essa condição de hipóxia (diminuição dos níveis de oxigênio tecidual) ativa o fator heterodimérico induzível pela hipóxia (HIF) que induz a transcrição de genes, os quais, em conjunto com outras proteínas como a angiopoetina-2, estimulam a formação de novos vasos, que se direcionam para a massa tumoral. Esse processo é denominado angiogênese e garante o estabelecimento dos níveis de oxigênio e a homeostase nutricional do tumor (Feitelson *et al.*, 2015).

Associado aos eventos angiogênicos, outros de degradação e remodelamento da matriz extracelular (MEC), a qual é composta por proteínas como colágeno, laminina, vitronectina e fibronectina, ocorrem para que o tumor e a rede vascular continuem se desenvolvendo, resultando na invasão de tecidos adjacentes pelas células tumorais. Esses processos ocorrem através da ação das proteases endógenas, produzidas tanto pelas células do estroma quando pelas células tumorais. Existe uma grande variedade dessas enzimas, como as metalo, aspártico, cisteíno e serino proteases (Van Dijk *et al.*, 2013; Bonnans *et al.*, 2014), as quais são ativadas em pH ácido (entre 3,5 e 5,5) e, portanto, suas atividades estão aumentadas em ambientes de hipóxia, como o tumoral (Visse e Nagase, 2003). Cada tipo tumoral apresenta características próprias de degradação proteolítica, como, por exemplo, a perda do colágeno VII no melanoma (Kirkham *et al.*, 1989), câncer de mama (Wetzels *et al.*, 1991) e no câncer de próstata (Nagle *et al.*, 1995), enquanto no tumor de cólon, a degradação da laminina é a mais comum (Pyke *et al.*, 1994).

O fenômeno da metástase é dinâmico, onde interações complexas ocorrem entre as células do tumor e do hospedeiro, como mostrado na Figura 1. Em primeiro lugar, grupos ou células individuais do tumor devem se destacar do tumor primário, um processo conhecido como dissociação. Em seguida, as células tumorais se infiltram ativamente no estroma e entram na vasculatura ou sistema linfático (intravasamento), que irão transportá-las para locais distantes, onde elas se prenderão a pequenos vasos. Em seguida, as células tumorais deixam ativamente a vasculatura (extravasamento) e invadem o órgão alvo, sendo consideradas de elevado potencial metastático as que concluem este processo. Fatores como a vigilância imunológica, parada do ciclo celular e estímulos proliferativos do microambiente determinarão se essas células irão morrer, permanecer quiescentes ou formar uma massa de tumor clinicamente aparente (Mcgary *et al.*, 2002; Tse e Kalluri, 2007).

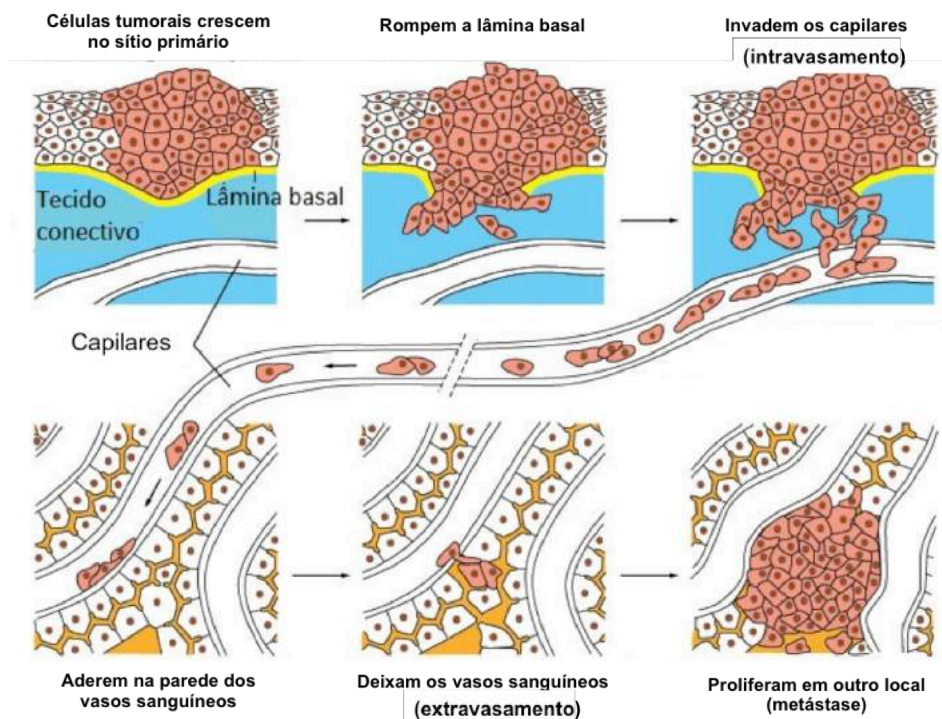


Figura 1. Progressão tumoral. Figura adaptada, original disponível em: <http://thefutureofthings.com/3094-smart-bombing-cancer/>. Acesso em: 24/05/2015.

Durante os processos de invasão, migração e colonização de outros sítios pelas células tumorais, participam um grupo de moléculas de adesão, presentes na superfície celular, as quais também desempenham papéis importantes em outros processos biológicos, incluindo organogênese, homeostase do tecido, sobrevivência

celular, cicatrização de feridas e respostas imunes/inflamatórias (Koukoulis *et al.*, 1998; Xiong *et al.*, 2013; Seguin *et al.*, 2015). Tais moléculas incluem as caderinas, as integrinas, as selectinas e a superfamília de imunoglobulinas, que têm estruturas semelhantes e desempenham papéis fundamentais em etapas únicas ou múltiplas da cascata metastática. Essas moléculas interagem entre si podendo se ligar a outras da mesma classe (interação homofílica), ou de classe distinta (interação heterofílica) ou de ambas as formas (Chothia e Jones, 1997).

Os membros da superfamília de imunoglobulinas estão envolvidos em adesões célula-célula homo e heterofílicas. A superfamília inclui uma variedade de moléculas de adesão celular (CAM), com especificidades distintas para ligantes, como a ICAM (intercelular), NCAM (neuronal), Ep-CAM (epitelial), VCAM (vascular), dentre outras (Rougon e Hobert, 2003).

As caderinas são moléculas transmembranares constituídas por domínios repetidos que medeiam as interações homofílicas célula-célula dependentes de cálcio. Essa superfamília compreende mais de cem diferentes membros, sendo a E- (epitelial) e N- (neural) caderinas amplamente expressas nos tecidos epiteliais e neurais, respectivamente (Shapiro *et al.*, 2007).

As integrinas são glicoproteínas transmembranares heterodiméricas que consistem de subunidades α e β ligadas entre si não-covalentemente, cujo complexo determina a força de ligação ao seu ligante e a sua especificidade. Oito subunidades α e dezoito subunidades β , combinam-se para formar vinte e quatro heterodímeros diferentes com especificidades distintas para as proteínas da MEC, como colágenos, laminina, fibronectina, vitronectina e receptores de superfície celular (e.g.: ICAM-1, VCAM-1, e L1-CAM) (Plow *et al.*, 2000; Seguin *et al.*, 2015).

Um número muito grande de integrinas contribui para a progressão tumoral, podendo variar consideravelmente entre tecidos normal e tumoral. Níveis aumentados da expressão de algumas integrinas, como a $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_v\beta_6$ estão correlacionados com a progressão da doença em vários tipos de tumores como melanoma, mama, próstata, pulmão e cólon (Seguin *et al.*, 2015). Além disso, a expressão de integrinas em tipos celulares normais associados aos tumores também contribui para a progressão tumoral. A interação entre pericitos e células endoteliais, via integrina $\alpha_4\beta_1$, é importante para a promoção de neovascularização (angiogênese) tumoral, bem como pela secreção de citocinas e fatores de crescimento pelos monócitos presentes no microambiente tumoral. A

expressão de $\alpha_{IIb}\beta_3$ nas plaquetas são importantes para promover uma ponte entre as células tumorais e o fibrinogênio, favorecendo a disseminação metastática (Desgrosellier e Cheresh, 2010).

Os domínios citoplasmáticos das integrinas conectam, via proteínas citosólicas adaptadoras (e.g.: vinculina, talina e α -actinina) e sinalizadoras (e.g.: FAK e c-SRC), ao citoesqueleto de actina, formando uma estrutura denominada ponto de adesão focal (Figura 2), além de mediar transdução de sinais (Anthis e Campbell, 2011). Conseqüentemente, as integrinas são mediadoras importantes para a adesão e migração, contribuindo para os contatos célula-célula por interações diretas com seus receptores homólogos ou indiretamente, por meio de uma ponte intercelular entre os componentes da MEC e moléculas sinalizadoras intracelulares (Xiong *et al.*, 2013; Seguin *et al.*, 2015).

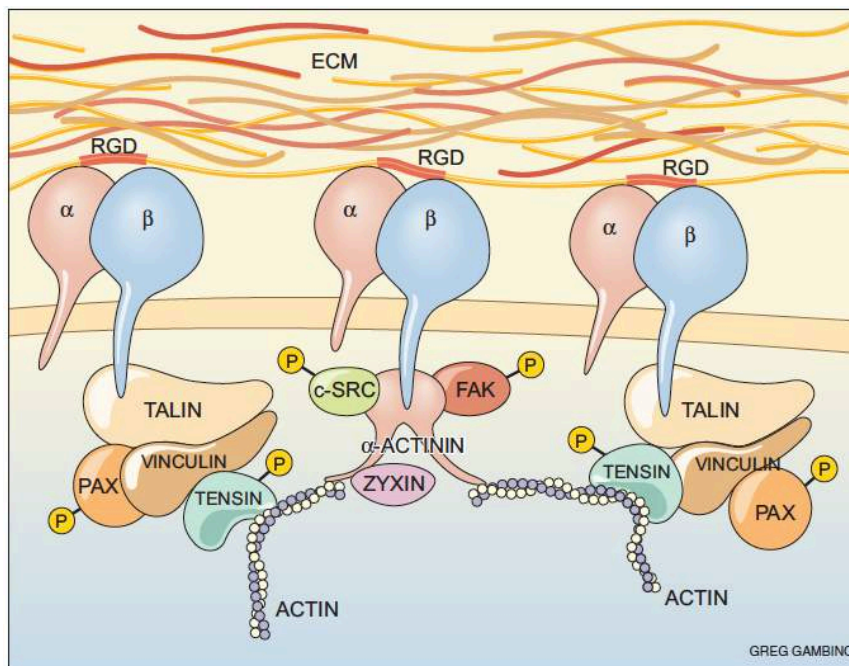


Figura 2. Adesão focal. A adesão focal está envolvida na transdução de sinais mediados pelas integrinas. Os domínios citoplasmáticos das integrinas se conectam diretamente a proteínas adaptadoras ou sinalizadoras do citoesqueleto, tais como α -actinina, vinculina e quinase de adesão focal (FAK). Esse complexo resulta em estímulos favoráveis à migração, proliferação e sobrevivência celular (Aiyer e Varner, 2005).

Quando as integrinas interagem com seus ligantes específicos, há o recrutamento de FAK através de suas subunidades β . FAK, então, sofre autofosforilação, associando-se a Src, o que resulta na ativação destas duas quinases. Em seguida, o complexo ativo FAK/Src recruta as proteínas p130CAS e

paxilina que, por sua vez, se associam à Crk levando à ativação de RAC 1 (substrato 1 da toxina botulínica C3 relacionado à Ras), PAK, e JNK e NFκB. Alternativamente, o complexo FAK/Src recruta e ativa RAP1 (proteína 1 próxima à Ras, do inglês *Ras-proximate-1*) levando à ativação de ERK e MAPK, estimulando, então, esta via proliferativa celular. FAK, ainda, é capaz de induzir a progressão do ciclo celular através de um aumento na expressão de ciclina D1 e, ainda, inibir a apoptose por ativação da via PI3K-AKT e inibição da p53 (Xiong *et al.*, 2013; Sulzmaier *et al.*, 2014). Por outro lado, a ausência de interação entre as integrinas e os componentes da MEC promove uma parada no ciclo celular, inibindo a via proliferativa e promovendo um aumento nos estímulos antiproliferativos que, ao final, resultarão em morte celular (Guadamillas *et al.*, 2011).

1.2 MORTE CELULAR

Os mecanismos de morte celular têm sido, tradicionalmente, divididos em morte celular programada (PCD), que requerem gasto de energia, e em morte celular necrótica que, por sua vez, não envolve gasto energético (Elmore, 2007). Ainda, a morte celular por necrose causa, tipicamente, uma intensa resposta imunológica, o que está ausente na PCD (Taylor *et al.*, 2008; Proskuryakov e Gabai, 2010). Entretanto, recentemente, tem ficado claro que os mecanismos que envolvem a PCD e a necrose podem, algumas vezes, se sobrepor e, ainda, que a necrose é um processo mais regulado do que se pensava, anteriormente (Galluzzi *et al.*, 2012).

A forma clássica de PCD é a apoptose, às vezes chamada de PCD tipo I, em que a célula sofre uma série de mudanças moleculares, bioquímicas e morfológicas (Elmore, 2007). Um dos primeiros marcadores moleculares de apoptose é a externalização dos resíduos de fosfatidilserina da membrana celular, que podem ser detectados por marcação com o reagente Anexina V (Leventis e Grinstein, 2010; Hankins *et al.*, 2015). As primeiras alterações visíveis da apoptose são a diminuição do tamanho da célula e uma condensação da cromatina (picnose). Isso é seguido por uma fragmentação do núcleo e cromatina (cariorrexe), vesiculação da membrana celular e, finalmente, o brotamento de uma série de estruturas ligadas à

membrana chamadas corpos apoptóticos. O pequeno tamanho dos corpos apoptóticos facilita a fagocitose por macrófagos nos quais os materiais são digeridos por enzimas contidas nos fagossomos. Uma vez que o material celular não é liberado para o espaço intersticial, não há reações inflamatórias decorrentes da apoptose (Tower, 2015).

O mecanismo molecular da apoptose inclui a ativação sequencial de uma série de cisteíno proteases chamadas de caspases (Figura 3) (Shalini *et al.*, 2015). As caspases estão presentes no citoplasma da maioria das células, principalmente na forma inativa (pró-caspase). Sob condições adequadas, as caspases podem promover uma auto-ativação por clivagem catalítica e podem, também, ativar outras caspases, criando, assim, uma cascata de auto-amplificação. Caspases iniciadoras (*e.g.*: caspase-9) clivam e ativam, subsequentemente, as caspases efetoras (*e.g.*: caspase-3), que por sua vez clivam numerosas proteínas celulares, incluindo aquelas do citoesqueleto. A mitocôndria desempenha um papel central na regulação da via apoptótica e na ativação das caspases em células de mamífero. As células contêm uma mistura de proteínas pró- e antiapoptóticas da *família BCL-2*, a qual compreende três subfamílias de proteínas que possuem entre um e quatro domínios homólogos (BH1, BH2, BH3 e BH4). A subfamília pró-apoptótica, compostas pelas proteínas BAX, BAK e BOK, não possui o domínio BH4 e promove a apoptose através da formação de poros na membrana mitocondrial externa. A subfamília antiapoptótica compreende proteínas que contenham os quatro domínios BH, como BCL-2, BCL-XL e BCL-W, podendo se ligar às proteínas pró-apoptóticas para inibir a formação desses poros. A maior parte dos membros desta subfamília também possui domínios transmembranares e são, portanto, tipicamente associada à membrana. A subfamília *BH3-only* é um grupo estruturalmente diverso de proteínas (*e.g.*: BIK, BID, BIM, BMF) que apresenta homologia apenas no domínio BH3. Essas proteínas promovem uma permeabilização da mitocôndria, por ativação de outros membros da *família BCL-2* como BAD e BAX, através de poros formados na estrutura da membrana mitocondrial (Taylor *et al.*, 2008; Pickarski *et al.*, 2015).

A apoptose é iniciada em resposta a sinais de morte que podem ser tanto intrínsecos quanto extrínsecos. A via intrínseca da apoptose é promovida por estresses celulares, incluindo danos no DNA, ativação de oncogenes, hipóxia, estresse oxidativo e irradiação. Esses estímulos deslocam o equilíbrio das atividades citoplasmáticas a favor dos fatores pró-apoptóticos por alteração da expressão e/ou

da estabilidade das proteínas, resultando em permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de fatores mitocondriais pró-apoptóticos para o citoplasma (Figura 3). Esses fatores mitocondriais incluem o citocromo c, Smac/DIABLO e a serino protease HtrA2. O citocromo c se liga e ativa as proteínas citoplasmáticas Apaf-1 e pró-caspase-9. Juntas, essas proteínas formam uma estrutura chamada apoptossomo que, por sua vez, leva a clivagem da pró-caspase-9 em caspase-9 ativa. Smac/DIABLO e HtrA2 inativam especificamente as proteínas inibidoras da apoptose (IAP), favorecendo, ainda mais, a via apoptótica. Na sequência, outro grupo de proteínas é liberado a partir da mitocôndria, incluindo o fator de indução de apoptose (AIF), a endonuclease G (EndoG) e a DNase ativada por caspase-3 (CAD), as quais agem no núcleo promovendo a condensação e fragmentação do DNA (Tower, 2015).

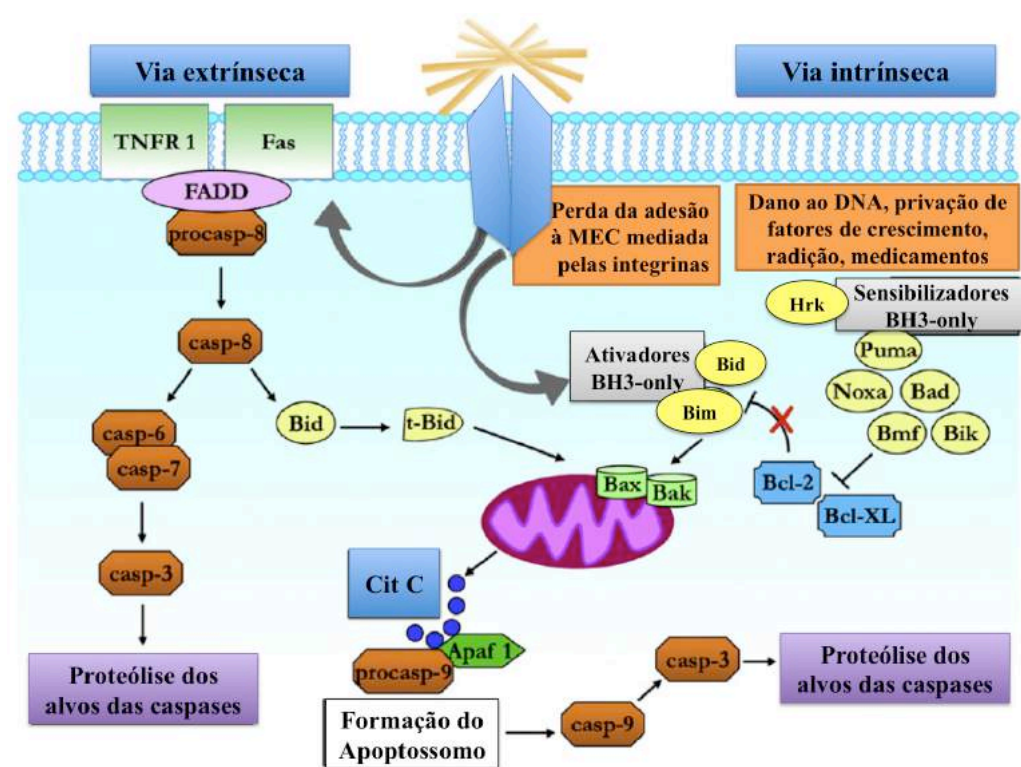


Figura 3. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose. A perda de contato entre integrinas e matriz extracelular, dano ao DNA, privação de fatores de crescimento, radiação e outros fatores levam à ativação ou dos receptores de morte (via extrínseca) ou da mitocôndria (via intrínseca). Na via extrínseca, a ativação dos receptores de morte (Fas ou TNFR1), promove aumento na atividade da caspase-8 a qual cliva e ativa as caspases executoras (e.g.: caspase-3). Na via intrínseca, a ativação de BAX/BAK é promovida por proteínas da família *BH3-only*, tais como BIM, BAD, BIK, PUMA, HRK, BMF e NOXA. Dentre eles, BID e BIM (ativadores), promovem diretamente a montagem dos oligômeros BAX-BAK, enquanto os outros membros da família *BH3-only* (sensibilizadores), neutralizam as funções antiapoptóticas de Bcl-2 o que, indiretamente, induz a ativação de BAX/BAK. Como resultado final, o citocromo c é liberado para o citoplasma, levando à formação do apoptossomo e consequente ativação de caspases executoras. Adaptado de Paoli et al. (2013).

A via extrínseca da apoptose envolve a sinalização ativada por receptores transmembranares para o fator de necrose tumoral (TNF). Esses receptores compartilham um domínio intracelular envolvido na sinalização chamada de "domínio de morte" e são, por vezes, chamados de "receptores de morte". Por exemplo, em células que expressam TNFR1 (receptor para TNF 1), o hormônio TNF- α se liga a este receptor resultando na ativação da caspase-8 (iniciadora) e, conseqüentemente, em apoptose.

Por sua vez, a morte celular por necrose é caracterizada por aumento no volume e rompimento da membrana celular (Proskuryakov e Gabai, 2010). A liberação do conteúdo citoplasmático para o espaço intersticial, tipicamente, resulta em inflamação. A necrose foi tradicionalmente conhecida por ser um processo tóxico independente de energia, onde as células são passivamente destruídas. Por exemplo, em muitos tipos de células, níveis moderados de estresse pelo calor ou radiação induzirá a apoptose, enquanto que calor ou radiação extremos causarão necrose. No entanto, estudos recentes sugerem que, exceto sob condições extremas de estresse, a necrose também é um processo regulado e é ativada por estímulos patológicos e fisiológicos específicos, sendo, algumas vezes, referida como PCD tipo III ou necroptose (Degterev *et al.*, 2014). A necrose programada independe da participação das caspases e pode ser classificada dependendo do envolvimento de fatores específicos. Por exemplo, decorrente de estresses celulares, incluindo isquemia, hipóxia, e ativação dos receptores para TNF, há indução da necroptose, que envolve a quinase RIP1, a via de sinalização JNK e a mitocôndria resultando no rompimento da membrana celular (Galluzzi *et al.*, 2012; Pasparakis e Vandenabeele, 2015). Muitas formas de necroptose envolvem a clivagem de proteases mitocondriais por cisteíno proteases como a calpaína e/ou catepsina, seguido por liberação de AIF pelas mitocôndrias. No núcleo, o AIF interage com a EndoG translocada da mitocôndria para mediar a fragmentação do DNA. Estudos em andamento, sobre a morte celular, revelam que existem múltiplos tipos de apoptose e necrose programada, e que estes mecanismos podem se sobrepor dependendo do tipo de célula e da natureza do estresse.

Outro tipo de morte celular programada é a autofagia, por vezes, chamada de PCD tipo II (Kroemer *et al.*, 2008; Galluzzi *et al.*, 2012). A autofagia é um processo celular de "auto-alimentação" no qual parte do citoplasma e das organelas são sequestradas dentro de vesículas chamadas autofagossomos. Os autofagossomos,

então, se fundem aos lisossomos para promover a degradação do material celular. A morte autofágica é caracterizada pela ausência de condensação da cromatina e por extensa auto-vacuolização do citoplasma. Notavelmente, a autofagia é um mecanismo de sobrevivência que é ativado em células submetidas a privação de nutrientes ou fatores de crescimento. Na persistência dessa condição, a morte celular pode ocorrer por autofagia ou, também, por apoptose (Coates *et al.*, 2010).

Os mecanismos da PCD podem ainda ser divididos em subtipos baseados em uma variedade de critérios, incluindo a dependência pelas caspase e o grau de sobreposição com a necrose (Galluzzi *et al.*, 2012). Por exemplo, a aponecrose compartilha características tanto da apoptose quanto da necrose, e pode representar um ponto médio entre essas duas formas de morte celular (Papucci *et al.*, 2004; Yakovlev e Faden, 2004). Paraptose é um evento independente das caspases e é caracterizada por vacuolização citoplasmática e pela necessidade de transcrição e tradução de genes. A paraptose pode ser induzida por sinalização via IGF-I ou outros fatores existentes em células de mamífero cultivadas, embora também possa ocorrer *in vivo* (Sperandio *et al.*, 2004). *Anoikis* se refere a PCD apoptótica que é induzida pela perda da adesão celular aos componentes da MEC (Paoli *et al.*, 2013), podendo prosseguir, tanto pela via intrínseca quanto pela extrínseca, dependendo do tipo de célula, sendo sua resistência uma das características dos tumores metastáticos (Taddei *et al.*, 2012; Zhong e Rescorla, 2012). Finalmente, temos a cornificação que é a forma especializada de PCD que ocorre nos queratinócitos da epiderme e que envolve a caspase-14. Na cornificação, o material da célula é mantido para formar a camada mais externa da pele sendo, em última análise, eliminada por descamação (Galluzzi *et al.*, 2012; Eckhart *et al.*, 2013).

A morte celular programada possui um importante papel no desenvolvimento humano, incluindo a destruição de células que apresentam falhas durante o processo replicativo e a renovação do número de células em grande parte dos tecidos. Ainda, a PCD parece estar relacionada ao mecanismo de ação de muitas terapias utilizadas no tratamento do câncer, em sua maioria, culminando em morte por apoptose (Zhang *et al.*, 2004; Tower, 2015).

1.3 TRATAMENTOS PARA O CÂNCER

Um dos maiores desafios para o tratamento do câncer é a ocorrência de metástase, visto que, apesar do conhecimento existente acerca do mecanismo de colonização de áreas distantes, ela ainda constitui a maior causa de morte e falhas do tratamento. Atualmente, dispomos de recursos para o tratamento do câncer primário como a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia, que podem ser usados de forma isolada ou combinada. Embora algumas terapias sejam direcionadas para impedir o estabelecimento ou a prevenção da metástase, estas ainda estão em fase clínica de desenvolvimento, existindo, portanto, uma carência de métodos para esta finalidade terapêutica (Desgrosellier e Cheresch, 2010; Scaringi *et al.*, 2012; Alizadeh *et al.*, 2014).

O procedimento cirúrgico é o mais indicado, quando em ausência de metástase, para os casos onde se faz necessária a retirada do tumor primário. Essa abordagem é feita em duas etapas: a biópsia para estabelecer o diagnóstico e as características histopatológicas, e a excisão, com amplas margens de segurança, para as lesões confirmadas como neoplasias (Kitano *et al.*, 2006; Farma *et al.*, 2015). A radioterapia utiliza a radiação ionizante gerando injúrias no material genético, destruindo as células tumorais, por impedir a sua multiplicação. Embora os avanços técnicos em radioterapia, tais como a radioterapia guiada por imagem e a radioterapia de intensidade modulada, têm permitido a aplicação da radiação de maneira mais precisa nos tumores, os tecidos normais saudáveis também recebem doses significativas de radiação, responsáveis pelos efeitos colaterais que podem ser observados. Dependendo da região atingida pela radiação, esses efeitos incluem anovulação ou azoospermia, epitelites, mucosites e mielossupressão (leucopenia e plaquetopenia) (Inca, 2014; Bourgier *et al.*, 2015; Higgins *et al.*, 2015). Várias técnicas de imunoterapia vêm sendo desenvolvidas, nas quais, se utilizam estímulos das próprias defesas do corpo como o interferon- α , interleucina-2 ou, ainda, a transferência de linfócitos T citotóxicos (LTCD8+), que podem ser usadas para reduzir células tumorais residuais e o risco de recorrência e metástase. Apesar de promissora, a imunoterapia é ainda uma técnica antineoplásica adjuvante, usada especialmente para destruir as células cancerosas residuais, após intervenção

cirúrgica ou outro tratamento (Hildebrandt *et al.*, 2014; Madorsky Rowdo *et al.*, 2015).

A quimioterapia antineoplásica utiliza fármacos que atuam em nível celular, sobre o tumor primário e na metástase estabelecida. De maneira geral, interferem no processo de proliferação celular não destruindo seletiva ou exclusivamente células tumorais sendo, portanto, inespecíficos. Dentre os fármacos utilizados, têm-se os agentes citotóxicos (alquilantes, antimetabólitos e antibióticos) que agem de forma a interromper a divisão celular e desencadear o processo de morte celular, na sua maioria das vezes, por apoptose (Kasibhatla *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Os efeitos colaterais da quimioterapia estão relacionados à destruição de células saudáveis, que estão em mitose, e incluem: toxicidade hematológica, com depressão da medula óssea, toxicidade gastrointestinal, cardíaca, hepática, pulmonar, neurológica, vesical/renal e dermatológica, e alterações metabólicas, reações alérgicas e anafilaxia (Araujo *et al.*, 2006). A grande maioria dos agentes quimioterápicos exercem sua ação sobre as células que se encontram em uma das fases do ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos como, por exemplo, o metotrexato (fase S), o estoposídeo (fase G2) e a vinscristina (fase M). Um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos, tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G0, como a cisplatina e as mostardas nitrogenadas, que são agentes alquilantes do DNA (Almeida *et al.*, 2005).

Ainda, como alternativa de tratamento, os hormônios/anti-hormônios são utilizados quando o tumor é derivado de tecidos sensíveis a algum hormônio e dele dependem para o crescimento e sobrevivência como são os tumores de mama, para o qual se pode utilizar inibidores competitivos de receptores para estrógeno (*e.g.*: tamoxifeno e raloxifeno), e o tumor de próstata, o qual responde ao bloqueio androgênico pela flutamida (Bastide *et al.*, 2013; Padilha *et al.*, 2013). Agentes antiangiogênicos como o bevacizumab (anticorpo monoclonal anti-VEGF) ou o sorafenid (inibidor de quinases que atua inibindo crescimento e ativando apoptose de células endoteliais e alguns tipos de tumorais) (Sun *et al.*, 2014; Liu Fw Fau - Cripe *et al.*, 2015) e inibidores de integrinas (Bell-Mcguinn *et al.*, 2011; Scaringi *et al.*, 2012) também vêm sendo utilizados por aumentarem o tempo de sobrevivência do paciente.

1.3.1 Proteases na oncologia

Proteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas, clivando peptídeos terminais (exopeptidases) ou aqueles dentro da cadeia polipeptídica (endopeptidases) (Palma *et al.*, 2002). Extratos vegetais com um elevado teor de enzimas proteolíticas têm sido utilizados há muito tempo na medicina tradicional para o tratamento de cancro (Batkin S Fau - Taussig *et al.*, 1988; Targoni *et al.*, 1999), como agentes antitumorais (Guimarães-Ferreira *et al.*, 2007; Otsuki *et al.*, 2010), para distúrbios digestivos (Kelly, 1996; Mello *et al.*, 2008) e como imunomoduladores (Melis, 1990; Lotti, 1993; Leipner *et al.*, 2001; Otsuki *et al.*, 2010). Misturas enzimáticas contendo papaína (*Carica papaya*), tripsina e quimiotripsina demonstraram ter eficácia clínica atuando como supressores tumorigênicos, reduzindo disseminação metastática e aumentando o tempo de sobrevivência ou mesmo aliviando os efeitos adversos gerados pelo tratamento convencional e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (Leipner e Saller, 2000; Beuth, 2008). Gerard (1972) demonstrou, também, que a administração oral de bromelina, enzima proteolítica advinda de *Ananas comosus*, promoveu remissão de tumores malignos com poucos efeitos colaterais aos pacientes.

Apesar dos inúmeros estudos sobre as formas de atuação das proteases no câncer, os seus mecanismos de ação não estão completamente elucidados. Para as proteases bromelina e papaína, são demonstradas, sobre diversas linhagens tumorais, suas atividades citotóxicas e pró-apoptóticas (Beers *et al.*, 2000; Dhandayuthapani *et al.*, 2011; Amini *et al.*, 2013). Outro possível mecanismo, já descrito para bromelina, é a atividade imunomodulatória (Fitzhugh *et al.*, 2008) e a modulação da expressão de moléculas de adesão, impedindo a manutenção e propagação das células tumorais (Pillai *et al.*, 2013), esta última, também presente no mecanismo antitumoral da actinidina, uma protease do kiwi (Čavić *et al.*, 2012). Desser *et al.* (2001) relataram a ação de misturas proteolíticas combinadas com a bromelina na redução dos níveis da citocina TGF- β em sangue humano. Esse fator está relacionado com a proliferação, diferenciação celular e atividade imunossupressora tumoral (Moses e Barcellos-Hoff, 2011).

1.4 PROTEASES DO LÁTEX DE *Vasconcellea cundinamarcensis* COM ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIMETASTÁTICA

Nos últimos anos, nosso grupo vem estudando as propriedades bioquímicas e farmacológicas de cisteíno-proteases derivadas do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, sinonímia *Carica candamarcensis*, nome popular *mamão das montanhas*. Essa é uma planta típica da costa oeste da América do Sul (Figura 4) e se caracteriza por apresentar um tronco grosso geralmente ramificado (Figura 4A), medindo até 10 m de altura, contendo uma coroa compacta de folhas na sua parte terminal ou nas extremidades das ramificações. O fruto é elipsóide, de coloração amarelada quando maduro (Figura 4B), com cinco depressões largas e longitudinais (Figura 4C), mede de 5 a 15 cm de comprimento, sendo sua polpa delgada, aquosa, aromática e comestível somente após o cozimento (León, 2000). O látex coletado das camadas mais externas dos frutos verdes se apresenta rico em carboidratos, vitaminas, sais minerais e peptídeos de baixo peso molecular, além de enzimas da classe das cisteíno proteases, ausentes na *Carica papaya*, planta amplamente estudada e que pertence à mesma família. Essas proteases possuem uma cisteína no sítio ativo e seu mecanismo de catálise envolve a participação de um grupamento tiólico. A família de cisteíno proteases C1 é a mais numerosa dentre essas proteases e correspondem às enzimas estruturalmente semelhantes à papaína (Baeza *et al.*, 1990; Bravo *et al.*, 1994).

Uma das funções propostas para o látex na planta é sua participação na defesa contra patógenos. A presença de quitinases no látex de *Caricaceae* funcionaria como defesa contra fungos. Outra função proposta é a proteção contra herbívoros através da presença de inibidores de serino proteases, os quais inibiriam as enzimas digestivas dos herbívoros causando uma disfunção e aumentando a chance de evitar um ataque recorrente do mesmo herbívoro (Azarkan *et al.*, 2004).

Também foi demonstrado que as cisteíno proteases presentes no látex de *Caricaceae* (*Carica papaya*) possuem efeito tóxico sobre larvas de insetos herbívoros. Larvas de lepidípteros acusavam o efeito tóxico das proteases os quais eram abolidos após tratamento das enzimas com inibidores da atividade proteolítica (Konno *et al.*, 2004). Esses experimentos demonstraram que a atividade enzimática é essencial para o efeito tóxico.

Outro dado importante que corrobora a hipótese da função do látex atuando como um mecanismo de defesa para a planta, e que após injúrias consecutivas no fruto imaturo de *Carica papaya*, a composição bioquímica do látex sofre modificações. A papaína presente no látex passa a ser liberada com uma maior atividade proteolítica, provavelmente para aumentar a defesa contra larvas de insetos. Além disso, outras três substâncias têm sua concentração aumentada no látex dessas plantas: uma proteína inibidora de tripsina, uma quitinase classe II e uma enzima denominada glutaminil ciclase (Azarkan *et al.*, 2004). Esta última realiza a ciclização da glutamina presente em cadeias polipeptídicas liberando como subproduto a amônia, uma substância volátil que possui efeitos inibitórios sobre alguns microrganismos (Banuelos *et al.*, 2000).



Figura 4. *Vasconcellea cundinamarcensis*. (A) Inflorescências, (B) Fruto maduro e (C) Frutos imaturos. Fontes: Ecocrop e Flickr.

Outro papel fisiológico proposto para as enzimas proteolíticas do látex de *Caricaceae* está relacionado com o mecanismo de coagulação do látex após um processo de injúria. Foi descrito haver modificações na composição de peptídeos presentes no látex de *Carica papaya* quando este era coletado em intervalos diversos após a incisão do fruto imaturo deste vegetal. Os dados mostraram que durante a coagulação do látex, vários peptídeos são processados de uma maneira ordenada (Silva *et al.*, 1997). A ativação e processamento de proteases em sequência e a formação de coágulo no local da ferida sugerem um mecanismo de defesa similar ao encontrado em tecidos animais (Moutim *et al.*, 1999).

Descrevemos que, pela separação cromatográfica em coluna Sephadex-G10, se obtêm frações que podem ser agrupadas em dois picos denominados de P1G0 e P2G10, sendo que as cisteíno proteases que compõem o primeiro pico apresentam

atividade proteolítica seis vezes superior às proteases de *C. papaya*, enquanto P2G10 apresenta níveis insignificantes desta atividade (Teixeira *et al.*, 2008).

P1G10 possui atividade cicatrizante sobre dermoabrasões (Mello, 2006) e queimaduras em camundongos, além de atividade citoprotetora e cicatrizante gástrica em ratos (Mello *et al.*, 2008) (Patente – USPTO, 11/378.196 “*Proteases from Carica having mitogenic activity and their methods of use*” publicado 17/03/2006, USA). Em estudos de toxicidade aguda, foi constatado que P1G10 possui baixa toxicidade, sendo a sua dose letal maior que 5 mg/kg por administração intraperitoneal e endovenosa, e acima de 300 mg/kg na via oral. Ainda, a fração não altera a atividade das enzimas do complexo citocromo P450 e não apresenta efeito mutagênico, medido pelos testes de Ames e micronúcleo, em concentrações que garantem sua aplicação terapêutica com margem de segurança por diferentes vias de administração (Villalba, 2010). O estudo farmacocinético da fração P1G10 mostrou que para a administração subcutânea, a biodisponibilidade da fração é semelhante à via endovenosa, de forma que se obtém níveis de eficácia farmacológica (Lemos, 2009). Ainda, foram obtidas formulações de liberação controlada em β -ciclodextrina (Denadai *et al.*, 2006) e inclusão em lipossomas, além dos resultados dos estudos clínicos de fase I como cicatrizante cutâneo. A intenção do grupo é viabilizar os estudos clínicos (fases II-III) e registro na ANVISA, inicialmente, como cicatrizante cutâneo e, a *posteriori*, como cicatrizante gástrico.

Em ensaios pré-clínicos com modelos murinos de melanoma com baixo potencial metastático, B16F1, melanoma com alto potencial metastático, B16F10, e tumor de Ehrlich, P1G10 demonstrou considerável efeito antitumoral e antimetastático. Uma redução de aproximadamente 88% na massa do tumor foi observada para os animais portadores de melanoma B16F1, quando tratados com 5 mg/Kg de P1G10 e, ainda, uma redução de 52% da celularidade, comparado ao grupo controle, para os animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich e tratados na dose mencionada (Viana, 2010; Dittz *et al.*, 2015). Foi observado que P1G10 reduziu em 55% os níveis tumorais de VEGF, em relação ao grupo controle sugerindo uma provável ação antiangiogênica da fração, sobre o tumor, a qual, ainda, levou à diminuição da ocorrência (83%) e número de pontos metastáticos (82%) no pulmão de camundongos portadores de melanoma B16F10 (Figueiredo, 2009). Os mecanismos observados para a ação sobre a linhagem B16F10 incluem a

indução da apoptose, perda da adesão e da capacidade de invasão celular, com resultados máximos obtidos na concentração de 100 µg/mL (Dittz, 2011).

Apesar dos evidentes efeitos de P1G10, não é possível definir essas ações a um grupo ou a apenas uma enzima presente na fração. Sabemos que quando submetida à cromatografia em coluna CM-Sephadex C-25, a fração P1G10 dá origem a dois picos proteicos principais (CMS1 e CMS2), tendo o primeiro uma atividade proteolítica três vezes maior que o segundo (Teixeira *et al.*, 2008). Demonstramos, também, que os efeitos de P1G10 sobre as linhagens tumorais de melanoma murino B16F10 e carcinoma de cólon murinho CT26.WT eram mantidos na fração CMS2 e não em CMS1. CMS2 mostrou atividade antimetastática nos dois modelos, na dose de 5 mg/Kg e indução da apoptose na concentração de 100 µg/mL. A citotoxicidade, avaliada sobre as linhagens tumorais (B16F10 e CT26.WT) e sobre linhagens não-tumorais (CHO – células epiteliais de ovário de hamster chinês; e BHK-21 – fibroblastos de rim de hamster chinês) mostrou que a fração CMS2 possui seletividade para as células tumorais, com valores de CC-50 de 1,1 e 10,5 µg/mL, respectivamente, e de 454 e 440 µg/mL para as células normais, respectivamente. Como forma de estudar os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos farmacológicos das frações, em especial sobre suas ações antitumorais e antimetastáticas, Dittz (2011) demonstrou que as frações P1G10 e CMS2 exercem atividade citotóxica frente linhagens celulares normais e tumorais, sendo que CMS2 mostrou seletividade para as linhagens tumorais. Ainda, estas frações promoveram aumento na quantidade de DNA fragmentado em células tumorais, por uma via dependente de caspases e diminuíram a adesão celular aos diferentes componentes da MEC e a capacidade de invasão. Por meio de análise proteômica, após eletroforese em gel bidimensional, foram comparados os níveis de proteínas entre as linhagens B16F10, tratada com 10 µg/mL de CMS2 por 24h, e Melan-A (melanócito murino não tumorigênico - controle), onde se observou que o tratamento com esta sub-fração foi capaz de reverter, a valores comparáveis aos de Melan-A, o nível de expressão de quatro proteínas em B16F10: nucleofosmina 1, proteína de choque térmico 65, proteína ligante a calciclina e fator de iniciação da tradução eucariótica 4H. Essas proteínas estão relacionadas com os eventos de transformação celular, progressão tumoral e desenvolvimento de metástases, sugerindo alvos moleculares que corroboram os efeitos celulares previamente descritos para esta sub-fração (Lemos, 2014).

Por outro processo cromatográfico, em coluna Mono-S Sepharose, pode-se purificar de CMS2 cinco isoformas de proteases, denominadas CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5 (Teixeira *et al.*, 2008). Essas proteases apresentam uma massa molecular de aproximadamente 23 kDa e atividades amidásicas semelhantes. A partir do sequenciamento da porção N-terminal, observou-se que as proteínas CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3 e CMS2MS4 compartilham sequencias idênticas enquanto que a protease CMS2MS5 difere das demais por uma mudança na posição de dois aminoácidos (Gomes, 2008). Dentre as cinco isoformas, as proteases CMS2MS1 e CMS2MS2 mostraram atividade mitogênica em linhagem murina de fibroblasto (L929), resultado de um aumento da atividade da Erk2, no caso de CMS2MS2. Esse resultado indica que estas duas proteases contribuem para o efeito cicatrizante de frações menos purificadas de *V. cundinamarcensis* (Gomes *et al.*, 2005).

Considerando que as frações P1G10 e CMS2, derivadas do látex de *V. cundinamarcensis*, possuem atividade antimetastática, este trabalho se propôs a estudar a participação das proteases isoladas sobre a adesão e morte de células da linhagem murina de melanoma metastático (B16F10), como parte do mecanismo, no intuito de identificar uma ou mais destas proteases que estariam envolvidas com este efeito.

2 JUSTIFICATIVA

Na quimioterapia do câncer são utilizados fármacos com pouca ou nenhuma seletividade contra as células tumorais. Em vista disso, nesse tratamento se manifestam efeitos tóxicos que, por vezes, são os responsáveis pela morte e/ou falhas da terapia. Esses fármacos atuam, geralmente, sobre o ciclo celular, ou seja, apenas em massas tumorais em franco desenvolvimento, quer sejam do tumor primário ou das metástases. Essa última é, sem dúvida, a forma tumoral responsável pela alta morbidade e mortalidade da doença.

Na atualidade, dispomos de poucos fármacos e/ou outras terapia que impeçam os processos de invasão dos tecidos adjacentes e da colonização de outros órgãos pelas células tumorais. Assim, é de grande interesse obter agentes que possuam seletividade contra as células tumorais e que evitem o estabelecimento de metástases.

Como já descrito, a fração P1G10 e sua sub-fração CMS2 possuem atividade antitumoral e antimetastática sobre diferentes modelos murinos (melanoma e carcinomas), relacionados ao efeito citotóxico, indução de apoptose e diminuição da adesão e invasão das células tumorais. Dessa forma, neste trabalho, visamos identificar, dentre as proteases isoladas de CMS2, aquela(s) que contribui(em) para a atividade antimetastática, considerando os efeitos sobre a adesão e morte celular, em linhagem murina de melanoma metastático (B16F10).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é estudar os mecanismos sobre a adesão e morte celular pelos quais as proteases que compõem a sub-fração CMS2 promovem efeitos antimetastáticos em tumor de melanoma murino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Obtenção das proteases CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5;
- 3.2.2. Determinação do efeito citotóxico das proteases sobre B16F10 (melanoma metastático murino) e Melan-A (melanócito não tumorigênico murino);
- 3.2.3. Avaliação do efeito das proteases sobre a adesão de B16F10 em placas de poliestireno e sobre as adesões focais, por quantificação da área de vinculina;
- 3.2.4. Avaliação dos níveis das subunidades de integrinas (α_4 , α_5 , α_v e β_1), em células tumorais após o tratamento com as proteases;
- 3.2.5. Análise da fragmentação do DNA em células B16F10 tratadas com as proteases;
- 3.2.6. Quantificação da apoptose em células B16F10 tratadas com as proteases;
- 3.2.7. Determinação dos níveis de ativação e/ou expressão, em células tratadas com as proteases, de proteínas da via apoptótica (pró-caspase 3, caspase 3 e pró-caspase 9 e caspase 9);
- 3.2.8. Avaliação do fluxo de Ca^{2+} nuclear e mitocondrial;
- 3.2.9. Avaliação do efeito antimetastático em modelo murino de melanoma, da(s) protease(s), eleita(s) por demonstrar(em) efeito nos mecanismos celulares envolvidos na adesão e na morte celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Biológicos

Látex exudado de frutos imaturos de *Vasconcellea cundinamarcensis* originário do Chile (Exsicata n°15063 depositada na Universidad de La Serena, Chile), cedido pelo Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Células de melanoma murino com alto potencial de colonização pulmonar (metastática), B16F10, cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - São Paulo, Brasil. Células de melanócito murino, Melan-A, gentilmente cedidas pelo Dr. Roger Chamas do Centro de Investigação Translacional em Oncologia (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, SP, Brasil).

Camundongos machos da linhagem C57Bl6, 6-8 semanas de idade, adquiridos do Centro de Bioterismo (CEBIO), ICB, UFMG. O protocolo experimental utilizando animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, Protocolo n° 229/2013.

4.1.2 Reagentes e solventes

PCR DNA Marker Loading Dye – **AmResco, São Paulo, Brasil.**

Azul-brilhante de Coomassie G-250; azul de bromofenol; bis-acrilamida; dodecil sulfato de sódio (SDS) e N',N',N',N'-tetrametil-etileno-diamina (TEMED) - **Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA.**

BSA (*Bovine serum albumine* - albumina de soro bovino tipo V) - **Calbiochem, St. Diego, EUA.**

Mitycam, sonda fluorescente para cálcio mitocondrial – **CalciumLab-UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.**

Anticorpos anti- α_4 -FITC; anti- α_4 -FITC; Isotipo IgG-FITC; anti- α_5 -PE; anti- β_1 -PE; Isotipo IgG-PE; anti-caspase 3; anti-caspase 9 e anti-GAPDH – **Cell Signalling Technology Inc., Boston, MA, EUA.**

Meio de cultura RPMI 1640 - **Gibco-BRL Corporate Headquarters, Gaithersburg, EUA.**

ATV (solução aquosa de tripsina) contendo: tripsina (0,20 g), versene (0,02 g) e água deionizada q.s.p. (100,00 mL) - **Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, SP, Brasil**

Glicina; KCl P.A. (cloreto de potássio); KH_2PO_4 P.A. (dihidrogenofosfato de potássio); NaCl P.A. (cloreto de sódio); NaOH P.A. (hidróxido de sódio); tetraborato de sódio - **Labsynth Produtos para Laboratório LTDA, Diadema, SP, Brasil.**

Acetato de sódio P.A.; bicarbonato de sódio P.A.; etanol P.A.; etileno-diamino-tetracetato dissódico (EDTA) P.A.; fluoreto de sódio; fosfato monobásico de potássio P.A.; fosfato monobásico e dibásico de sódio P.A.; metanol absoluto; reagente de Folin 2N, Triton X-100 - **Merck, Darmstadt, Alemanha.**

Acrilamida - **Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia.**

Tampão para amostra de DNA desnaturante (TNDIOX); Tampão TAE (TAE50) – **Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil.**

Ácido cítrico monoidratado; ácido para-hidroxi-mercuribenzóico; adenosina tri-fosfato (ATP); ampicilina sódica; benzoil-arginil-p-nitro-anilida (BAPNA); aprotinina; brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol2-ila)-2,5-difeniltetrazólio ou sal de tetrazólio (MTT); caseína; dimetilsulfóxido (DMSO); ditiotreitól (DTT); estreptomina, forbol-12-miristato-13-

acetato (PMA); glicina; HCl P.A. (ácido clorídrico); H₂SO₄ (ácido sulfúrico); iodeto de propídeo (PI); iodoacetamida (IAA); L-cisteína; leupeptinina; ortovanadato de sódio; pirofosfato de sódio; resasurina; resina Sephadex G-10; resina Sephadex C-25; resina Mono-S Sepharose; ribonuclease A de pâncreas bovino (RNase); sulfato de estreptomicina; solução HEPES 1M pH 7,0-7,6; Trinton X 100; tris-base - **Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA.**

Fluo-4 AM - **Thermo Scientific, San Jose, California, EUA.**

Nitrogênio Líquido - **White Martins do Brasil S/A, Contagem, MG, Brasil.**

4.1.3 Soluções

4.1.3.1 Anestésica

Ketamina 10%..... 10 mL
Xilasina 2%.....7,5 mL

4.1.3.2 Azul-brilhante de Coomassie para coloração de géis

Corante azul-brilhante de Coomassie G-250..... 125 mg
Ácido acético glacial P.A..... 10 mL
Água destilada q.s.p..... 100 mL

4.1.3.3 BAPNA (*N*-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilina) 100 mM

BAPNA.....90 mg
DMSO.....2 mL

Esta solução foi mantida a -20° C até o momento de uso.

4.1.3.4 Bloqueio para Western Blot

Caseína 0,5 g
TTBS q.s.p. 50 mL

4.1.3.5 Corante de Azul de Tripano 4%

Azul de tripano	120 mg
Solução salina 0,9 % q.s.p.	30 mL

4.1.3.6 Corante de cristal violeta

Cristal Violeta	200 mL
Etanol	10 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

4.1.3.7 Descorante de géis

Metanol P.A.....	5 mL
Ácido acético glacial P.A.....	7 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

4.1.3.8 Fixadora para géis

Metanol P.A.....	50 mL
Ácido acético glacial P.A.....	10 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

4.1.3.9 Fluorocrômica hipotônia de Iodeto de Propídio (HFS)

Iodeto de propídio.....	5 mg
Citrato de sódio	100 mg
Triton X 100	0,5 mL
Água destilada q.s.p.	100 mL

4.1.3.10 Gel concentrador desnaturante 5% acrilamida

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v).....	166,80 µL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4 % SDS (p/v)	250,00 µL
Água deionizada	571,20 µL
Solução aquosa de APS 10% (p/v).....	10,00 µL
TEMED	2,00 µL

4.1.3.11 Gel separador desnaturante 12% acrilamida

Solução aquosa de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v)	1,20 mL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8; 0,4 % SDS (p/v)	750,00 µL
Água deionizada	1,02 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v)	25,00 µL
TEMED	5,00 µL

4.1.3.12 Meio RPMI 1640 pH 6,9 ou 7,4 (NaHCO₃ 14 mM, Hepes 4 mM, Ampicilina 0,27 mM, Estreptomicina 0,06 mM)

Meio RPMI-1640 desidratado (comercial)	10,43 g
Bicarbonato de sódio	1,20 g
Hepes	2,38 g
Ampicilina sódica.....	0,10 g
Estreptomicina	0,10 g
Água deionizada q.s.p.	1,00 L

O pH foi ajustado para 6,9 ou 7,4 com NaOH 1 M. O meio foi adicionado e esterilizado por filtração em membrana (0,22 µm)

4.1.3.13 Salina 0,9%

NaCl.....	9 g
Água destilada q.s.p.....	1 L

4.1.3.14 Tampão de acetato de sódio 1,0 M pH 5:

Acetato de sódio.....	136,08 g
Água destilada q.s.p.	1,00 L

O pH foi ajustado para 5 com NaOH 1 M. O tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5, foi obtido a partir da diluição desta solução.

4.1.3.15 Tampão de acetato de sódio 1,2 M pH 5:

Acetato de sódio.....	163,30 g
Água destilada q.s.p.	1,00 L

4.1.3.16 Tampão de amostra eletroforese desnaturante

Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4 % SDS (p/v).....	700,00 µL
Glicerol.....	300,00 µL
SDS.....	100,00 mg
Azul de bromofenol.....	0,12 mg

4.1.3.17 Tampão de ativação (Tampão acetato de sódio 1 M, cisteína 25 mM, EDTA 10 mM e DTT 5 mM)

Cisteína 200 mM	40 µL
EDTA 500 mM	4,00 mL
DTT.....	160,00 mg
Tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) q.s.p.....	200,00 mL

4.1.3.18 Tampão de corrida eletroforese desnaturante

Tris base.....	755,00 mg
Glicina.....	3,60 g
SDS.....	250,00 mg
Água destilada q.s.p.....	250,00 mL

4.1.3.19 Tampão de PBS pH 7,4 (Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,84 mM, NaCl 0,14 M e KCl 2,68 mM)

Fosfato dibásico de sódio.....	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio.....	250,00 mg
Cloreto de sódio.....	8,20 g
Cloreto de potássio.....	200,00 mg
Água destilada q.s.p.....	1,00 L

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C , 2 atm durante 20 min.

4.1.3.20 Tampão de PBS/EDTA pH 7,4 (EDTA 3,68 mM)

Fosfato dibásico de sódio.....	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio anidro.....	250,00 mg
Cloreto de sódio.....	8,20 g
Cloreto de potássio.....	200,00 mg
EDTA (dihidratado).....	1,37g
Água destilada q.s.p.....	1,00 L

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação a 120°C , 2 atm durante 20 min.

4.1.3.21 Tampão de separação de células ativadas por fluorescência (FACS)

FBS.....	100 mL
Azida sódica.....	100 mL
PBS pH 7,4.....	1L

4.1.3.22 Tampão de solubilização

NaH ₂ PO ₄	600 mg
Etanol	50 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

O pH foi ajustado para 4,5 com NaCl 1,0 M

4.1.3.23 Tampão de transferência para Western Blot

Metanol absoluto	100 mL
Glicina	7,2 g
Tris base	1,52 g
Água deionizada q.s.p.	500 mL

4.1.3.24 Tampão TBS

Tris-HCl 2 M pH 8.....	25 mL
Cloreto de sódio.....	4,5 g
Ajustar o pH para 7,5 e água destilada q.s.p.	500 mL

4.1.3.25 Tampão Tween Towbin Transfer Buffer (TTBS)

Tween 20.....	0,125 mL
TBS q.s.p.	250,00 mL

4.1.4 Kits

Substrato Immun-Star HRP - **Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA.**

Actin Cytoskeleton/ Focal Adhesion Staining; ApopNexin™ FITC Apoptosis Detection (APT 750); CytoMatrix™ Cell Adhesion Strips (ECM 101 – 105) – **Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha.**

Wizard® Genomic DNA Purification – **Promega, Wisconsin, EUA.**

Effectene Transfection Reagent – **Qiagen, Limburgo, Países Baixos**

4.1.5 Equipamentos

Sistema de ultrafiltração Amicon modelo 8200 - **Amicon Inc., MA, EUA.**

Medidor de pH modelo NT-PH2 (Novatécnica Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP, Brasil), equipado com eletrodo modelo V-620 C - **Analion Aparelhos & Sensores Ind. & Com., Ribeirão Preto, SP, Brasil.**

Citômetro de Fluxo – FACScan Cytometer - **Becton & Dickinson, San Diego CA, USA.**

Bomba Peristáltica Econo-Pump; Fonte de energia para eletroforese e transferência em “Western Blot” modelo Xi 3000, com ajuste digital de tensão, corrente e potência elétrica - **Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA.**

Refrigerador ajustado à temperatura de +4°C; freezer à temperatura de -20°C - **Consul-Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, SP, Brasil.**

Banho Maria calibrado a 37°C; Bomba de Vácuo Diapump - **Fanem, São Paulo, SP, Brasil.**

Ultra-sonicador modelo FS-28H - **Fisher Scientific, EUA.**

Agitador Magnético modelo 252 - **Fizatron Equipamentos Elétricos para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil.**

Hemocitômetro (câmara de Neubauer) 0,0025m² x 0,100 mm de profundidade - **FORTUNA® , Berlim, Alemanha.**

Balança analítica Toledo - **Gehaka Eletro-Eletrônica Ltda, São Paulo, SP, Brasil.**

Centrifuga refrigerada de média rotação, modelo Z252MK, equipada com rotor modelo 220.87.V01 - **Hemle Labortechnik, Gosheim, Alemanha.**

Liofilizador modelo LI-5 acoplado a uma centrifuga tipo "speed vac" - **Incibrás Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil.**

Câmera digital para microscópio invertido, Moticam 2500 5.0 MPixel - **Motic, Xiamen, China.**

Bomba Aspirante modelo "H" - **Nevoni Equipamentos Médicos e Odontológicos, Lapa, SP, Brasil.**

Estufa incubadora 37 °C, atmosfera controlada e contendo 2,5% CO₂ (v/v) - **Nuaire Equipaments, Pymouth, MN, USA.**

Sistema de Cromatografia L. quida de R. pida Performance (FPLC) equipado com programador Gp 250 Plus, coletor de fra..es modelo FRAC-1000, registrador modelo REC 102, unidade de detec..o UV modelo UV-1 e bombas modelo P-500 - **Pharmacia LKB, Uppsala, Suíça.**

Espectrofotômetro de duplo feixe para faixas UV (ultra-violeta) e visível, modelo UV-150-02 - **Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão.**

Cuba de Eletroforese com sistema de refrigeração modelo Z37, 240-1 - **Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA.**

Microscópios ópticos OLYMPUS CX4IRE e OLYMPUS BX41, FIL; Nikon, modelo Alphaphot-2 YS2-T, JAP/POL, série 07197 - **Studar^{Lab}, Metrimpex, Hungria.**

Centrífuga refrigerada, Sorvall ST 16R, equipada com rotor para placas modelo M-20; Leitor de placas Multiskan GO - **Thermo Scientific, San Jose, California, EUA.**

Capela com fluxo laminar de ar ultra-filtrado - **Veco do Brasil Indústria & Companhia de Equipamentos, Campinas, SP, Brasil.**

Software LSM Image Examiner; Software Spectralyzer; Microscópio Confocal Carl Zeiss LSM510 META – **Zeiss, Jena, Alemanha.**

4.1.6 Diversos

Microtubos de Fechamento Seguro de 500 e 1500 µL - **Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA e Eppendorf, Hamburg, Alemanha.**

Solução reveladora Kodak; solução fixadora Kodak – **Dental Tiradentes, Belo Horizonte, MG, Brasil.**

Transiluminador com luz fluorescente para visualização de géis - **EMB, Brasil.**

Barras magnéticas - **Fizatron, Equipamentos Eletrônicos para Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil**

Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2, 20, 200 e 1000 µL, acompanhados de ponteiros de polipropileno - **Gilson Sas, França**

Software GraphPad Prism versão 6 – **GraphPad Software, La Jolla, California, EUA.**

Agulhas e seringas descartáveis - **INJEX Indústrias Cirúrgicas, LTDA., Ourinhos, Brasil**

Lâminas e lamínulas - **INVICTA, São Paulo, Brasil**

Software Kodak versão 1D-3.5 acoplada à câmera digital Kodak modelo DC-40 para digitalização de imagens de géis, cálculo do peso molecular das proteínas e determinação de densitometria de bandas em “Western Blot” e eletroforese - **Kodak Company, Rochest, NY, EUA**

Membranas filtrantes de nitrato de celulose, com 0,45 µm e 0,22 µm de diâmetro de poro - **Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA.**

Garrafas de poliestireno de 50 ml para cultura, e placas de poliestireno de 96, 24 e 6 cavidades - **Nunc Inter Med A/S, Roskilde, Dinamarca**

Material cirúrgico (Pinças, tesouras e porta-agulhas), agulhas, fio de sutura SUTURIM - **Procure – Cirúrgica, Belo Horizonte, MG.**

Béqueres, Ehrlenmeyers, Funis, Pipetas graduadas, Provetas, Quitassatos, Balões volumétricos - **Pyrex[®], Cidade do México, México**

Tubos de polipropileno, com fundo cônico, de 15 e 50 mL de capacidade e dotados de tampa rosqueável - **Quimex Corning Incorporated, New York, NY, EUA**

Software ImageJ versão 1.48 – **SciJava, Dresden, Alemanha.**

Membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF); Sistema de filtração para acoplar em seringas com membrana de acetato de celulase com 0,2 µm; Placas de vidro com 8,0 x 10,0 x 0,3 cm de dimensões e aparatos para eletroforese (espaçadores e

pentos), saco de diálise com poro 10 kDa de diâmetro. **Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA.**

Software Sigma Plot versão 5.0 para análise de resultados em forma gráfica e testes estatísticos. **Sytat Software Inc., Richmond, CA, EUA.**

Filme de raio-X para detecção de Western Blot – **Thermo Scientific, San Jose, California, EUA.**

Software FlowJo versão 7.6.5 para análise dos dados de citometria de fluxo – **TreeStar Inc., Ashland, EUA.**

Tubos de ensaio com 14 X 1 cm de dimensões - **Vidrolabor-Thermex Astra Brasil Ind. Vidros, F. Vasconcelos, SP, Brasil**

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção de frações, sub-frações e proteinases do látex de *V. cundinamarcensis*

4.2.1.1 Coleta, secagem e armazenamento do látex

Foram feitas várias incisões com cerca de 0,2 cm de profundidade no epicarpo de frutos imaturos da espécie *Vasconcellea cundinamarcensis*, com posterior coleta do látex exudado em tubos de polipropileno, sendo armazenado a -20 °C. Posteriormente, o látex foi liofilizado e armazenado novamente nesta mesma temperatura até seu processamento (Baeza *et al.*, 1990).

4.2.1.2 Preparação do látex para cromatografia de gel filtração

Na preparação, 3 g de látex liofilizado de *V. cundinamarcensis* foi suspenso em 20 mL de tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) contendo: cisteína, 25 mM; EDTA, 10 mM; e DTT, 5 mM. Após 30 min de agitação lenta à temperatura ambiente, centrifugou-se o material durante 10 min a 9000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm de porosidade obtendo, assim, o látex ativado, usado posteriormente na purificação (Dubois *et al.*, 1988).

4.2.1.3 Separação cromatográfica do látex em coluna de gel filtração

A resina Sephadex G-10 (50 g) foi equilibrada durante 48h com 200 mL de tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) à temperatura ambiente. Após esse período, essa preparação foi deaerada e empacotada em uma coluna cromatográfica de vidro medindo 40,0 x 2,5 cm. Então, equilibrou-se a coluna por 24h com tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) com um fluxo constante de 0,25 mL/min. Em seguida, foi aplicado o sobrenadante, obtido no item 4.2.1.2, sobre a resina, utilizando acetato de sódio 1 M (pH 5,0) como eluente com um fluxo constante de 0,25 mL/min à temperatura ambiente e coletando frações de 5 mL. Posteriormente, as frações foram triadas mediante a determinação da densidade óptica em 280 nm para obter a concentração proteica e em 405 nm para a atividade amidásica (Dubois *et al.*, 1988).

4.2.1.4 Bloqueio dos grupos tiólicos

Para bloquear os sítios ativos durante a etapa subsequente de purificação, os grupos tiólicos das proteases foram bloqueados reversivelmente com para-hidroximercuribenzóico ácido (pOHMB) após eluição em Sephadex G-10. O inibidor reversível foi adicionado na proporção molar de 100:1 em relação à proteína, usando-se como parâmetros para cálculo da molaridade a concentração total de

proteínas e um valor médio do peso molecular das proteases de 23 kDa. O material foi incubado por 30 min à temperatura ambiente com leve agitação, seguido de diálise durante 48h (troca de solução a cada 12h) contra 1 L de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0).

4.2.1.5 Cromatografia em coluna de troca catiônica CM-Sephadex C-25

Pesou-se 3 g de resina CM-Sephadex C-25, deixando-a equilibrando com 200 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) durante 48h à temperatura ambiente. Após esse período, a resina foi deaerada e empacotada em uma coluna de vidro de dimensões 22,0 x 2,5 cm. Então, equilibrou-se a coluna por 24h com tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) com um fluxo constante de 0,5 mL/min.

Após a aplicação de 5 g da amostra (primeiro pico eluído da coluna G-10, após bloqueio dos grupos tiólicos e diálise), a coluna foi percorrida com o tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) a 0,5 mL/min durante 24h à temperatura ambiente; e então, eluída em um gradiente linear de concentração de acetato de sódio pH 5,0 de 0,1 a 1,5 M com o mesmo fluxo. As frações foram coletadas a cada 10 mL e monitoradas quanto à concentração de proteína e atividade amidásica. Após essa caracterização, as frações foram reunidas em picos e concentradas usando um sistema de ultrafiltração a 4 °C (item 4.2.1.7).

4.2.1.6 Cromatografia em coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose acoplada ao sistema FPLC

Foi usada a coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose acoplada ao sistema FPLC na purificação das proteínas eluídas da cromatografia em CM-Sephadex C-25. Foi aplicada uma quantidade de proteínas variando de 1 a 5 mg na coluna Mono-S Sepharose, sendo eluídas com um gradiente não linear de cloreto de sódio (0,1 mM a 400 mM) juntamente com 5 mM de EDTA e 25 mM de tampão tetraborato de sódio (pH 9,5). O fluxo foi de 1 mL/min e as frações foram coletadas

de acordo com os picos de densidade ótica em 280 nm. Os picos semelhantes das diferentes cromatografias realizadas nesse sistema foram reunidos e concentrados no sistema de ultrafiltração a 4 °C (item 4.2.1.7).

4.2.1.7 Concentração das amostras por ultrafiltração

As amostras provenientes da cromatografia de troca catiônica em CM-Sephadex C-25 e Mono-S Sepharose foram agrupadas conforme descrito nos itens 4.2.1.5 e 4.2.1.6, respectivamente, e concentradas no sistema de ultrafiltração Amicon®. Para isso, as frações foram submetidas à pressão contra uma membrana de 10 kDa de diâmetro de poro, no intuito de retirar o solvente e o sal sem contudo eliminar as proteínas com tamanho superior ao do poro. Após a redução do volume para aproximadamente 3 mL, a amostra foi suspensa com 100 mL de água milli-Q para livrar as frações do excesso de sal. O volume foi, então, reduzido novamente para aproximadamente 3 mL, com posterior adição de 100 mL de água milli-Q. O processo foi repetido três vezes. No final, cerca de 3 mL das frações foram recuperados e estocados a -20 °C.

4.2.1.8 Determinação da atividade amidásica

A atividade amidásica das frações foi determinada com o substrato sintético BAPNA. Na determinação da atividade amidásica específica, 10 µg das frações foram incubados a 37 °C com 1 mL do tampão de ativação (tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 8,0; cisteína 5 mM e EDTA 2 mM) juntamente com 3 µL da solução de BAPNA (preparada como descrita no item 4.1.3.3). Após surgimento de uma cor amarela, a reação foi paralisada com 60 µL de solução de ácido acético 60% (v/v). A determinação da concentração molar de para-nitro-anilida liberada (quantidade de produto formado) foi feita através da densidade ótica em 405 nm e sua relação com o coeficiente de extinção molar desta substância, que é $8800 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Baeza *et*

al., 1990). A atividade amidásica específica foi expressa em concentração molar de produto formado por unidade de massa da enzima em um determinado tempo, mais especificamente, $\text{nM produto} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ enzima.

4.2.1.9 Estimativa da concentração proteica

Para a definição do perfil proteico das frações eluídas das cromatografias em Sephadex G-10, CM-Sephadex C-25, foi usada a medida da densidade ótica das soluções. Frações da coluna Sephadex G-10 foram diluídas 1:100 em tampão acetato de sódio 1 M e as frações eluídas da coluna CM-Sephadex foram diluídas 1:10 em tampão acetato de sódio 0,1 M antes da leitura em 280 nm (Robinson, 1975).

Para determinação da concentração proteica, foi usado o método de Bradford (Bradford, 1976). Nesse caso, foram incubadas quantidades entre 1 μL e 10 μL das amostras completando o volume destas para 100 μL com cloreto de sódio 100 mM. Foi adicionado em seguida 1 mL da solução de azul brilhante de Coomassie (preparada como descrito em 4.1.3.2), sendo incubada por 15 min até a leitura da densidade ótica em 595 nm. Foi usada como padrão a proteína lisozima.

4.2.1.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

Utilizou-se o sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com SDS [“Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis” (SDS-PAGE)] descrito por Laemmli (1970), contendo um gel separador (preparado conforme descrito no item 4.1.3.11) o qual foi adicionado a uma placa de vidro com 8,0 x 10,0 x 0,3 cm de dimensões, munidas de espaçadores e vedantes de borracha. Após a polimerização desse gel, preparou-se o gel concentrador (conforme descrito no item 4.1.3.10) adicionando-o sobre o gel separador na presença de um pente com dez dentes. Depois de polimerizado, os pentes e os vedantes foram

cuidadosamente retirados, sendo a montagem colocada na cuba de eletroforese contendo o tampão de corrida (preparado conforme descrito no item 4.1.3.18). A pré-corrída foi desenvolvida a 80 V de tensão, 20 mA de corrente e 2 W de potência, durante 30 min a 7 °C.

Foi adicionado um volume do tampão de amostra (preparado conforme descrito no item 4.1.3.16), correspondente a 1/6 do volume total. Nas amostras contendo proteases também foi adicionado 1 µL de MMS 50 mM anterior à fervura por 5 min para a desnaturação das mesmas. A aplicação foi feita nas canaletas localizadas no polo negativo do gel. O padrão de massa molecular utilizado era composto por 10 µg de ovalbumina, 45 kDa; 10 µg de quimiotripsinogênio, 25 kDa e 10 µg de lisozima, 14,3 kDa. A eletroforese foi desenvolvida a 80 V de tensão, 20 mA de corrente e 2 W de potência, durante aproximadamente 2h a 7 °C. O gel foi corado por Azul-brilhante de Coomassie, conforme descrito no item 4.2.1.11.

4.2.1.11 Coloração do gel por Azul-brilhante de Coomassie

Terminada a corrida eletroforética, o gel foi transferido para a solução fixadora (preparada como descrita no item 4.1.3.8) na qual permaneceu por 30 min. Após esse período, o gel foi lavado duas vezes com água destilada para hidratação. Depois, foi adicionada a solução de Azul-brilhante de Coomassie para coloração dos géis (preparada como descrita no item 4.1.3.2) a qual permaneceu por 30min ou até a visualização das bandas. O fundo do gel (“background”) foi descorado com a solução descorante preparada como descrito no item 4.1.3.7.

O gel foi fotografado (câmera digital Kodak DC-40) sobre um transiluminador para a análise dos resultados. A intensidade das bandas foi calculada por densitometria usando o Software ImageJ versão 1.48.

4.2.1.12 Determinação da massa molecular por eletroforese em condições desnaturantes

A massa molecular foi estimada através da análise do gel desnaturante corrido com o padrão de massa molecular (lisozima, 14,3 kDa; quimiotripsinogênio,

25 kDa e ovoalbumina, 45 kDa). A relação entre o logaritmo das massas moleculares dos padrões com sua distância de migração foi relacionada com a distância de migração das amostras para determinação da massa molecular destas (Lambin e Fine, 1979). Isso foi realizado utilizando o programa computacional Kodak versão 1D-3.5.

4.2.2 Ensaio Biológicos

4.2.2.1 *Cultivo das linhagens celulares*

Células de melanoma murino metastático, B16F10, foram cultivadas em meio RPMI 1640, pH 7,4 contendo 5% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), enquanto que melanócitos murino, Melan-A, foram cultivados em meio RPMI 1640, pH 6,9 contendo 5% (v/v) de FBS e suplementado com PMA (forbol 12-*o*-tetradecanoil-13-acetato) na concentração final de 0,5 μ M. Todas as linhagens foram mantidas em frascos de cultivo em estufa de cultura a 37 °C com atmosfera úmida e 5% (v/v) de CO₂.

Ao atingirem aproximadamente 90% de confluência, foram realizados sub-cultivos para os ensaios biológicos. Células B16F10 ou Melan-A foram inicialmente lavadas com PBS/EDTA pH 7,4 e em seguida foi adicionado tripsina 0,2% (v/v) diluída em RPMI 1640. Quando as células apresentavam-se desprendidas da superfície do frasco de cultivo, foi adicionado meio RPMI 1640 com FBS 5%.

4.2.2.2 *Avaliação da inibição da proliferação celular*

Para a determinação da inibição da proliferação foi preparada uma suspensão celular conforme descrito no item 4.2.2.1 e, em seguida, foram semeadas 2×10^3 células/100 μ L/cavidade de B16F10 ou 10^4 células/100 μ L/cavidade de Melan-

A em placas de poliestireno de 96 cavidades. As culturas celulares foram mantidas em estufa por 24h, garantido a adesão celular à superfície das cavidades. As células foram expostas por 72h a concentrações crescentes (0,1 a 500 µg/mL) de CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 ou CMS2MS5 utilizando-se como controle de viabilidade celular máxima, células expostas apenas a meio RPMI 1640 a 5% (v/v) de FBS. Após esse período, foram adicionados 10 µL de uma solução de sal de resazurina (10 mg/mL) em cada cavidade, sendo realizada, após 4h, a leitura espectrofotométrica, a 570 e 600 nm (O'brien *et al.*, 2000). A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada utilizando-se as diferenças entre as absorbâncias ($Abs_{570} - Abs_{600}$), descontados os valores do branco, sendo considerado 100% de viabilidade as leituras do grupo controle. Para o cálculo da concentração inibitória para 50% das células (CC-50), foi realizada uma transformação logarítmica dos valores das concentrações, $x = \log(\text{concentração})$, e uma regressão não linear por meio de uma curva sigmoideal dose-resposta, com o auxílio do software Graph Prism versão 6.

4.2.2.3 Avaliação da desadesão em superfície de poliestireno

Para a determinação do efeito das proteases sobre a adesão em placas de poliestireno, foi preparada uma suspensão de B16F10 conforme descrito no item 4.2.2.1 e, em seguida, foram semeadas 10^3 células/100 µL/cavidade em placas de 96 poços. Após 24h, o meio foi renovado, sendo as células expostas a diferentes concentrações (1, 10, 30 ou 50 µg/mL) das proteases CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 ou CMS2MS5. Decorridas 2, 4, 8 ou 24h de exposição, o sobrenadante das culturas contendo as células que perderam a adesão foi aspirado e reservado. Na placa, onde as células permaneceram aderidas, foi acrescentado um novo meio contendo resazurina (10 mg/mL). Após 4h, foi realizada a leitura espectrofotométrica, a 570 e 600 nm. A determinação da porcentagem de adesão foi feita por meio das diferenças entre as absorbâncias ($Abs_{570} - Abs_{600}$), descontados os valores do branco, sendo considerado 100% de adesão as leituras do grupo controle.

As células que perderam a adesão e estavam suspensas no meio reservado tiveram a sua viabilidade determinada exclusão do corante Azul de Tripano (item 4.1.3.5), na proporção de 1:1 do corante e da suspensão celular. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer sendo a viabilidade celular expressa em porcentagem (%) em relação ao grupo controle.

4.2.2.4 Avaliação da adesão em componentes da matriz extracelular

Para a avaliação do efeito das proteases sobre a adesão das células B16F10 aos componentes da matriz extracelular, foram seguidas as instruções do kit CytoMatrix™ Cell Adhesion Strips (MerkMillipore®) que continha placas de 96 cavidades revestidas com colágeno I, colágeno IV, fibronectina, vitronectina ou laminina. Inicialmente, as células foram cultivadas conforme descrito no item 4.2.2.1 e, para a obtenção da suspensão celular, foi utilizado apenas solução PBS/EDTA pH 7,4. Em seguida, as suspensões celulares foram submetidas à centrifugação a 400 x g por 5 min e as células lavadas com PBS pH 7,4. Esse procedimento foi realizado mais duas vezes sendo, então, as células expostas a CMS2MS3 na concentração de 10 µg/mL por 2, 4, 8 ou 24h. Após esse período, a viabilidade celular foi determinada pela exclusão do corante Azul de Tripano (item 4.1.3.5), na proporção de 1:1 do corante e da suspensão celular. Uma densidade de 4×10^4 células viáveis/100 µL/cavidade foi semeada em placas de 96 poços revestidos com os diferentes componentes da matriz extracelular. A incubação foi por 2h em estufa de cultura a 37 °C com atmosfera úmida e 5% (v/v) de CO₂. Após esse período, o meio contendo as células que não aderiram foi desprezado e os poços das placas foram lavados três vezes com 200 µL de PBS pH 7,4. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 µL de solução de cristal violeta 0,2% (item 4.1.3.6) e mantidas em temperatura ambiente, por 5 min. Em seguida, a solução de cristal violeta foi removida e as células lavadas três vezes com 300 µL de PBS pH 7,4. Após a lavagem, foram adicionados 100 µL de tampão de solubilização, fornecido pelo fabricante, sendo as culturas mantidas em temperatura ambiente por 5 min até completa solubilização do corante. Ao final, foi determinada a absorbância a 570 nm, sendo a adesão expressa em porcentagem (%), comparada ao controle (100%).

4.2.2.5 Quantificação de adesões focais

A quantificação do número de adesões focais em células B16F10, por meio da determinação da área absoluta de vinculina, foi feita de acordo com o recomendado no manual do kit Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining (MerkMillipore®). Inicialmente, células B16F10, obtidas conforme item 4.2.2.1, foram semeadas em lamínulas de vidro de 22 x 22 mm, na densidade de 5×10^4 células/mL. Após 24h de incubação em estufa 5% (v/v) de CO₂ e 37 °C, as células foram expostas a CMS2MS3 na concentração de 10 µg/mL por 2, 4, 8 ou 24h. Ao final da exposição, as células foram fixadas e marcadas com anticorpo monoclonal anti-vinculina, faloidina conjugada com TRITC e DAPI, conforme instruções do fabricante. As imagens foram captadas em microscópio confocal Carl Zeiss LSM 510 META (Zeiss®). Para a quantificação da adesão focal, constituída pela vinculina membranar, foi utilizado o software ImageJ versão 1.48, conforme Fan *et al.* (2013).

4.2.2.6 Determinação dos níveis das subunidades α_4 , α_5 , α_V e β_1 de integrinas

Células B16F10 (2×10^4 células/100 µL/cavidade), obtidas conforme item 4.2.2.1, foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa 5% (v/v) de CO₂ e 37 °C. Após 24h, as células foram expostas à CMS2MS3 10 µg/mL por 2, 4, 8 ou 24h. Terminado o período de tratamento, o sobrenadante foi reservado e as células aderidas foram removidas da superfície com 100 µL de solução PBS/EDTA pH 7,4. Todas as células (sobrenadante mais removidas) foram lavadas com PBS pH 7,4 e centrifugadas a 400 x g, 5 min, por três vezes. Após a lavagem, as células foram suspensas em 300 µL de solução tampão para FACS (item 4.1.3.21) e incubadas, por 30 min com anticorpos conjugados com FITC anti- α_4 , anti- α_5 ou controle isotipo IgG, e anticorpos conjugados com PE anti- α_V , anti- β_1 ou controle isotipo IgG.

A leitura das fluorescências foi feita em citômetro de fluxo (FACScan, BD®) e a análise dos dados com o auxílio do software FlowJo versão 7.6.5 (TreeStar®).

4.2.2.7 Fragmentação do DNA

O efeito da protease CMS2MS3 sobre a fragmentação do DNA de células B16F10 foi avaliado em citômetro de fluxo (FACScan, BD[®]) por meio da marcação do DNA de células tratadas com iodeto de propídio (PI) e por eletroforese em gel de agarose.

4.2.2.7.1 Marcação com iodeto de propídio

A fragmentação do DNA foi quantificada pelo conteúdo total de DNA de acordo com Souza-Fagundes *et al.* (2003). Inicialmente, células B16F10 cultivadas e obtidas conforme o item 4.2.2.1 foram semeadas em placas de 96 cavidades na densidade de 2×10^4 células/100 μ L/cavidade. Após 24h de incubação em estufa 5% (v/v) de CO₂ e 37 °C, as células foram expostas a CMS2MS3 nas concentrações de 1, 10, 30 ou 50 μ g/mL, por períodos de 2, 4, 8 ou 24h. Em seguida, as células contidas no sobrenadante da cultura foram submetidas a centrifugação (400 x g, 5 min) e juntadas com as aderidas na placa de cultura, sendo suspensas em um total de 300 μ L de uma solução HFS (item 4.1.3.9). Após 4h de incubação a 4 °C, ao abrigo da luz, a fluorescência dos núcleos individuais foi mensurada por citometria de fluxo (FACScan, BD). Os dados foram analisados com o auxílio do software FlowJo versão 7.6.5 (TreeStar[®]).

4.2.2.7.2 Eletroforese em gel de agarose

Células B16F10 foram cultivadas e obtidas conforme o item 4.2.2.1, sendo semeadas em placas de 6 cavidades na densidade de 5×10^4 células/cavidade/3 mL e incubadas em estufa 5% (v/v) de CO₂ e 37 °C. Após 24h, o meio foi desprezado e as células foram expostas a CMS2MS3 na concentração de 10 μ g/mL por 2, 4, 8 ou 24h. Após o tratamento, o meio contendo as células em suspensão foi reservado e

aquelas que permaneceram aderidas foram expostas à tripsina 0,2% (v/v) em RPMI 1640 para, então, serem agrupadas às demais. Em seguida, as células foram submetidas a centrifugação (400 x g, 5 min) e lavadas três vezes com PBS pH 7,4. A extração do DNA foi realizada conforme as orientações do kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega[®]), tendo a concentração de DNA determinada por leitura da absorbância das amostras a 260 nm [Concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) = $A_{260} \times 50$]. As amostras de DNA foram tratadas por 2h com RNase (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e armazenadas a -20 °C até a realização da corrida eletroforética.

Em 2 μL de amostra ou em 4 μL de padrão de corrida (PCR Marker Loading Dye, AMResco[®]) foi adicionado 1 μL de tampão para amostra de DNA não desnaturante (TNDIOX, pht[®]), sendo o volume final aplicado em um gel de agarose a 7% (p/v) contendo brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/mL}$. A eletroforese foi realizada em tampão TAE (TAE50, pht[®]) por aproximadamente 50 min a 80 V de tensão e 80 mA de corrente. O gel foi fotografado (câmera digital Kodak DC-40) sobre um transiluminador para a análise dos resultados. A intensidade das bandas foi calculada por densitometria usando o programa ImageJ versão 1.48.

4.2.2.8 Avaliação da apoptose

A avaliação do efeito de CMS2MS3 sobre a apoptose foi feita através da determinação dos níveis celulares de pró-caspase 3, caspase 3 ativa, pró-caspase 9 e caspase 9, por Western Blot, e por análise da marcação das células com Anexina V e PI, por citometria de fluxo.

4.2.2.8.1 Western Blot

Células B16F10 (2×10^5 células/mL), cultivadas e obtidas conforme item 4.2.2.1, foram semeadas em placas de 6 cavidades e incubadas em estufa 5% (v/v) de CO₂ e 37 °C. Após 24h, as células foram tratadas com CMS2MS3 na

concentração de 10 µg/mL, por 2, 4, 8 ou 24h, sendo utilizados como controle as células nos tempos 0 e 24h, sem exposição à protease. Após o tratamento, o sobrenadante das culturas contendo as células que perderam a adesão foi reservado e aquelas que permaneceram aderidas foram expostas à tripsina 0,2% (v/v) em RPMI 1640 para, então, serem agrupadas às demais. As células foram submetidas a centrifugação (400 x g, 5 min) e lavadas três vezes com PBS pH 7,4. Após a última lavagem, foram adicionados 500 µL de tampão de lise celular constituído de Tris-HCl 25 mM (pH 7,4); NaCl 75 mM; EDTA 0,4 mM; Triton X-100 0,5% (v/v); ortovanadato de sódio 0,4 mM; fluoreto de sódio 10 mM; pirofosfato de sódio 10 mM; leupeptinina 10 µg/mL; PMSF 740 µM e aprotinina 10 µg/mL, incubando por 30 min a 4 °C. Depois, as amostras foram submetidas à centrifugação a 14.000 x g, 4 °C, e o sobrenadante, constituído do lisado celular, foi recolhido e estocado a -20 °C até ser utilizado.

Após a corrida de eletroforese (realizada como descrita no item 4.2.1.10), usando 30 µg de proteínas do lisado celular, o gel foi incubado à temperatura ambiente durante 30 min com o tampão de transferência (composição descrita no item 4.1.3.23), em agitação lenta. Concomitantemente, uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de mesma dimensão do gel foi lavada por 1 min com metanol absoluto e depois incubada juntamente com oito papéis filtro de iguais dimensões com o tampão de transferência nas mesmas condições descritas anteriormente.

O “sandwich” foi montado com o gel e a membrana envoltos por quatro papéis filtro em cima e quatro em baixo. A transferência foi processada durante 45 min, em 24 V de tensão e 300 mA de corrente usando a célula de transferência. Após a transferência, a membrana de PVDF foi incubada na solução de bloqueio (composição descrita no item 4.1.3.4) por 1h. Depois, lavou-se a membrana três vezes em TTBS (composição descrita no item 4.1.3.25) sendo, posteriormente, incubada *overnight* à 4 °C, em agitação leve, em 10 mL dos anticorpos IgG de camundongo (diluído 1:1000 em TTBS) com especificidade para pró-caspase 3, caspase 3, pró-caspase 9, caspase 9 ou GAPDH. Lavou-se a membrana por 10 min em TTBS três vezes sendo posteriormente incubada por 1h com 10 mL de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluído 1:1000 em TTBS) a 4 °C. Lavou-se novamente a membrana por 10 min em TTBS três vezes sendo aplicado, em câmara escura, aproximadamente 1 mL do substrato Immun-Star HRP

(Bio-Rad[®]) para a visualização das bandas. Um filme de raio-X (Kodak[®]) foi exposto sobre a membrana de PVDF por aproximadamente 30s sendo, então, mergulhado em solução reveladora (Kodak[®]) até a visualização das bandas. Imediatamente após, o filme foi transferido para a solução fixadora (Kodak[®]) e, em seguida, lavado em água corrente.

4.2.2.8.2 Marcação com Anexina V-FITC/PI

A marcação das células de melanoma com Anexina V-FITC e PI, após o tratamento com a protease foi feita conforme as instruções do kit ApopNexin[™] FITC (Chemicon[®]). Para isso, células B16F10, cultivadas e obtidas conforme item 4.2.2.1, foram semeadas na densidade de 4×10^3 células/mL em placas de 96 cavidades e incubadas em estufa 5% (v/v) de CO₂ e 37 °C. Após 24h, as células foram tratadas com CMS2MS3 na concentração de 10 µg/mL, por 2, 4, 8 ou 24h, sendo utilizados como controle positivo células tratadas com estaurosporina 1 µM por 3h. Ao final do tratamento, o sobrenadante das culturas contendo as células que perderam a adesão foi reservado e aquelas que permaneceram aderidas foram expostas à tripsina 0,2% (v/v) em RPMI 1640 para, então, serem agrupadas às demais. As células foram submetidas a centrifugação (400 x g, 5 min) e lavadas três vezes com PBS pH 7,4. Após a última lavagem, as células foram marcadas com PI e Anexina V-FITC tendo as fluorescências mensuradas por citometria de fluxo (FACScan, BD[®]). Os dados foram analisados com o auxílio do software FlowJo versão 7.6.5 (TreeStar[®]), considerando como células apoptóticas aquelas que apresentaram alta intensidade de fluorescência para a Anexina V-FITC (medida no canal FL-1) e baixa intensidade de fluorescência para o PI (medida no canal FL-2).

4.2.2.9 Fluxo de cálcio celular

A avaliação do efeito de CMS2MS3 sobre o fluxo de cálcio foi feita por medida do cálcio nuclear/citoplasmático e mitocondrial.

4.2.2.9.1 Fluxo de cálcio nuclear/citoplasmático

As células B16F10, cultivadas e obtidas conforme item 4.2.2.1, foram semeadas na densidade de 5×10^5 células/2 mL sobre lamínulas de 25 mm de diâmetro e incubadas em estufa 5% (v/v) de CO₂ e 37 °C. Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, às células, foi incorporada uma sonda fluorescente indicadora de cálcio, fluo-4/AM (Invitrogen™) 10 µM, durante 40 min à temperatura ambiente. Após esse intervalo, as lamínulas foram lavadas com solução HEPES para retirar o excesso da sonda que não foi incorporada. As células foram, então, excitadas com o laser de Argônio 488 nm e a emissão foi capturada no intervalo 520-550 nm, no microscópio confocal Carl Zeiss LSM 510 META (Zeiss®), subtraindo-se a autofluorescência da amostra. Após 20s do início da aquisição, foram adicionados 100 µL de solução HEPES a fim de avaliar a influência de um estímulo mecânico no fluxo de cálcio. Decorridos 35s do início da aquisição foi adicionado CMS2MS3 à uma concentração final de 10 µg/mL, sendo a aquisição realizada até 100s. A coleta das imagens foi feita em duas regiões de profundidades diferentes com o *pinhole* totalmente aberto, realizando-se imagens de 512 x 512 pixels. As imagens captadas de modo temporal em diferentes profundidades foram analisadas separadamente utilizando os programas Examiner (Carl Zeiss) e Spectralyzer. A normalização da fluorescência foi realizada pela fluorescência basal. O *line scan* foi realizado com o *pinhole* na medida de captura de um *Airy unit* para a captação da fluorescência no plano focal.

4.2.2.9.2 Fluxo de cálcio mitocondrial

As células B16F10, cultivadas e obtidas conforme item 4.2.2.1, foram semeadas na densidade de 5×10^5 células/2 mL em lamínulas de 25 mm de diâmetro e incubadas em estufa 5% (v/v) de CO₂ e 37 °C. Após 24h foi realizada a transfecção das células com a sonda fluorescente para cálcio mitocondrial (Mitycam), conforme orientações do kit Effectene (Qiagen®). Após 24h da transfecção, as células foram, então, excitadas com o laser de Argônio 488 nm e a

emissão foi coletada no intervalo 520-550 nm, no microscópio confocal Carl Zeiss LSM 510 META (Zeiss®), subtraindo-se a autofluorescência da amostra. Após 20s do início da aquisição, foram adicionados 100 µL de solução HEPES a fim de avaliar a influência de um estímulo mecânico no fluxo de cálcio. Decorridos 90s do início da aquisição foi adicionado CMS2MS3 à uma concentração final de 10 µg/mL e, no tempo correspondente a 150s foi adicionado ATP (concentração final de 1 mM), sendo a aquisição realizada até 200s. A coleta das imagens foi feita em duas regiões de profundidades diferentes com o *pinhole* totalmente aberto, realizando-se imagens de 512 x 512 pixels. As imagens captadas de modo temporal em diferentes profundidades foram analisadas separadamente utilizando os programas Examiner (Carl Zeiss) e Spectralyzer. A normalização da fluorescência foi realizada pela fluorescência basal. O *line scan* foi realizado com o *pinhole* na medida de captura de um *Airy unit* para a captação da fluorescência no plano focal.

4.2.2.10 Avaliação da capacidade de colonização pulmonar de células B16F10 tratadas com CMS2MS3

A indução das metástases pulmonares foi realizada conforme descrito por Vantghem *et al.* (2003). A partir do cultivo de células B16F10 (item 4.2.2.1), foram obtidas cinco suspensões celulares utilizando-se solução PBS/EDTA pH 7,4, as quais foram acondicionadas em tubos plásticos tipo Falcon. As suspensões foram submetidas à centrifugação a 400 x g por 5 min e, em seguida, lavadas com PBS pH 7,4. Um dos tubos foi reservado para a contagem de células e inoculação imediata nos animais (grupo controle, 0h) enquanto que as células dos demais foram expostas à 10 µg/mL de CMS2MS3 por 2, 8 ou 24h ou PBS pH 7,4 por 24h. Durante o tratamento, as suspensões celulares foram mantidas em estufa a 5% (v/v) de CO₂ e 37 °C. Ao final do tratamento, a viabilidade celular foi determinada por meio da exclusão do corante Azul de Tripiano (item 4.1.3.5) e as células foram novamente submetidas à centrifugação (400 x g por 5 min). Em seguida, foi preparada uma suspensão de 5x10⁵ células viáveis/100 µL em PBS pH 7,4 para cada grupo experimental. Animais C57Bl6 (n = 5 animais/grupo) receberam o inóculo celular na

veia caudal e, após quinze dias, foram sacrificados em câmara de CO₂ e tiveram o número de colônias pulmonares e a massa deste órgão determinados.

4.2.2.11 Análises estatísticas

A construção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 6. Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média e comparados com os grupos controles. Foram realizadas análises de variância, one-Way ANOVA, seguidas de teste de Bonferroni, ou teste t de Student, sendo consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Ao longo da última década, nosso grupo de pesquisa tem mostrado que frações proteolíticas menos purificadas do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis* possui atividade antitumoral e antimetastática contra tumores murinos de pele, mama e cólon, na qual participam os efeitos imunomodulatório, antiangiogênico, citotóxico, inibidor da adesão e invasão. Dessa forma, o presente trabalho visou identificar a(s) protease(s) responsável(eis) pelo efeito antimetastático em melanoma murino bem como o mecanismo sobre a adesão e morte celular, envolvidos nesta atividade.

5.1 OBTEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEOLÍTICAS DO LÁTEX DE *Vasconcellea cundinamarcensis*

5.1.1 Obtenção da fração P1G10

O látex liofilizado foi dissolvido em tampão de ativação e aplicado à uma coluna cromatográfica preenchida com resina Sephadex G-10. A separação em dois picos bem definidos, P1G10 e P2G10 se fez a partir do perfil proteico (absorbância a 280 nm), como representado na Figura 5. Paralelamente, foi determinada a atividade amidásica de algumas frações que eram obtidas durante a cromatografia (atividade amidásica total), sendo este o principal parâmetro para a separação dos picos proteicos. O pico P1G10 correspondeu às frações de 25 a 42 e o P2G10 às frações de 48 a 66. As frações de 43 a 65 não foram agrupadas por, provavelmente, apresentarem contaminação dos dois picos selecionados. De um total de 15 g de látex aplicados na coluna, no qual 4,6 g correspondiam à quantidade total de proteínas, foram obtidos 2,9 g de P1G10 e 0,6 g de P2G10 o que corresponde a um rendimento total de 76%. As frações que compõem o pico P1G10 foram reunidas e submetidas à concentração e liofilização como descrito no item 4.2.1.7.

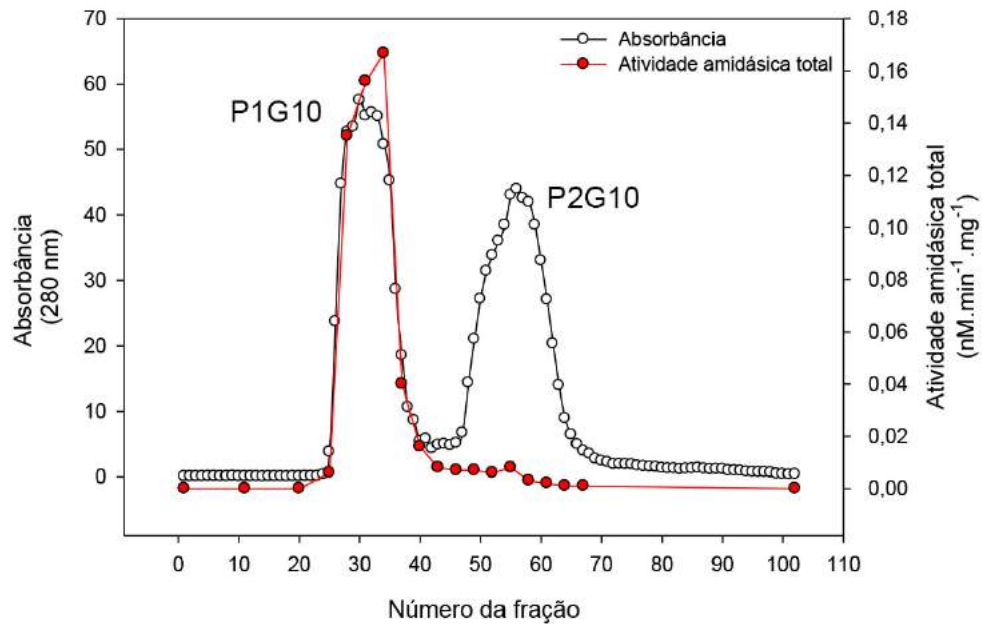


Figura 5. Perfil cromatográfico do látex em resina Sephadex G-10. A solução de látex ativado de *V. cundinamarcensis* foi aplicada em coluna contendo resina Sephadex G-10 e eluída com solução de acetato de sódio 1,0 M (pH 5,0), com fluxo de 0,25 mL/min. Frações de 5 mL foram coletadas para determinação do perfil proteico (absorbância a 280 nm) e atividade amidásica total.

A atividade amidásica específica de P1G10 foi de $29,09 \text{ nM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (item 4.2.1.8) e a quantidade de proteína total de $84,6 \pm 1,60\%$ (medido conforme item 4.2.1.9). Para avaliação da composição proteica, foi realizada uma eletroforese em condições desnaturantes (Figura 6) onde a análise do gel mostrou a presença de um perfil eletroforético que correspondia ao de outras amostras preparadas anteriormente, tendo as principais bandas proteicas massas moleculares de 23 a 27 kDa.

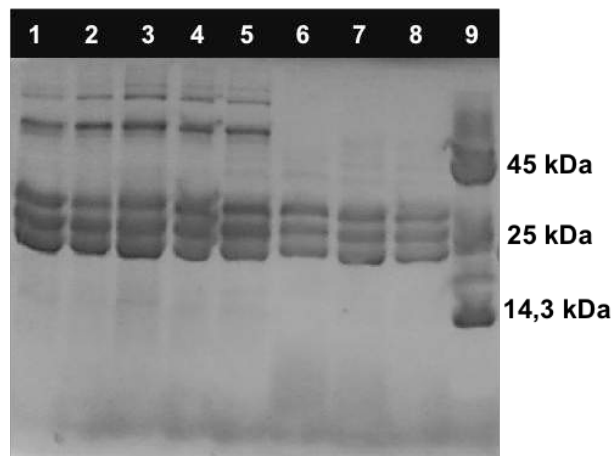


Figura 6. Perfil eletroforético de diferentes amostras de látex de *V. cundinamarcensis* e fração P1G10 em gel SDS/PAGE 12% em condições desnaturantes. Trinta microgramas de cada amostra foram aplicados para a corrida eletroforética e posterior coloração do gel por Azul-brilhante de Coomassie Blue. Canaletas 1 a 5, amostras de diferentes lotes de P1G10; canaletas 6 a 8, amostras de diferentes lotes de látex de *V. cundinamarcensis* e canaleta 9, padrão de peso molecular (10 μg de ovalbumina, 45 kDa; 10 μg de quimiotripsinogênio, 25 kDa e 10 μg de lisozima, 14,3 kDa).

5.1.2 Obtenção das sub-frações, CMS1 e CMS2, de P1G10

Para o fracionamento de P1G10 este, na quantidade de 5 g, foi submetido a processo cromatográfico em coluna preenchida com resina CM Sephadex C-25 (item 4.2.1.5). De acordo com a Figura 7, foram construídos o perfil proteico, determinado a 280 nm, e a atividade amidásica total dos eluatos, sendo esta última utilizada para a separação dos picos correspondentes a CMS1 (frações 114 a 139) e CMS2 (frações 140 a 168). As frações que compõem CMS1 e CMS2 foram reunidas, porém não liofilizadas.

Foram obtidos 886 mg de CMS1 e 838 mg de CMS2, correspondendo a um rendimento cromatográfico de, aproximadamente, 34% considerando as duas sub-frações. A atividade amidásica específica, determinada conforme item 4.2.1.8, foi de 745 $\text{nM}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para CMS1 e 247 $\text{nM}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para CMS2, sendo a concentração proteica (item 4.2.1.9) de 247 mg/mL para cada uma das sub-frações de P1G10.

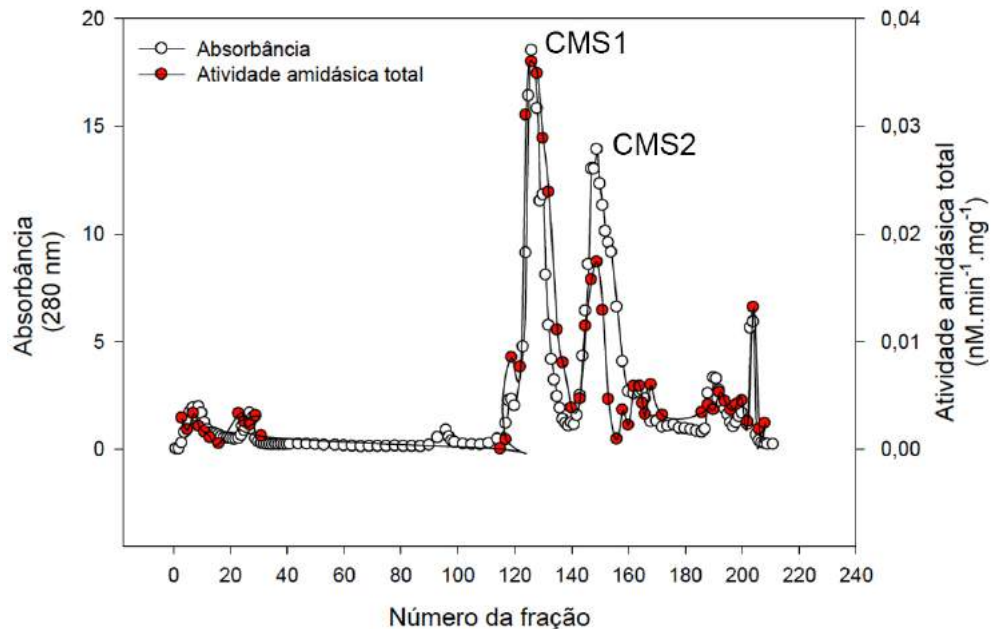


Figura 7. Perfil cromatográfico de P1G10 em resina CM Sephadex C-25. Uma quantidade de 5 g de P1G10 foi aplicada em coluna contendo resina CM Sephadex C-25 e eluída em gradiente de solução de acetato de sódio (0,1 – 1,2 M) com fluxo de 0,5 mL/min. Frações de 5 mL foram coletadas para determinação do perfil protéico (absorbância a 280 nm) e atividade amidásica total.

5.1.3 Obtenção das frações CMS2MS1 a CMS2MS5

Para purificar as proteases presentes na sub-fração CMS2, foi usada uma coluna de troca catiônica, Mono-S Sepharose, acoplada ao sistema FPLC (item 4.2.1.6). Como observado no cromatograma representativo exibido na Figura 8, após a cromatografia de CMS2 em coluna de troca catiônica, foi possível a separação de cinco picos, denominados CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5, de acordo com a ordem de eluição. Conforme o perfil do gradiente de NaCl, os três primeiros picos foram eluídos com 0,04 M de NaCl, o CMS2MS4 eluído com aproximadamente 0,08 M de NaCl e o CMS2MS5 eluído somente quando o gradiente é rapidamente aumentado até 0,4 M do sal. Esse perfil foi reproduzido nas múltiplas cromatografias de CMS2 nessa coluna.

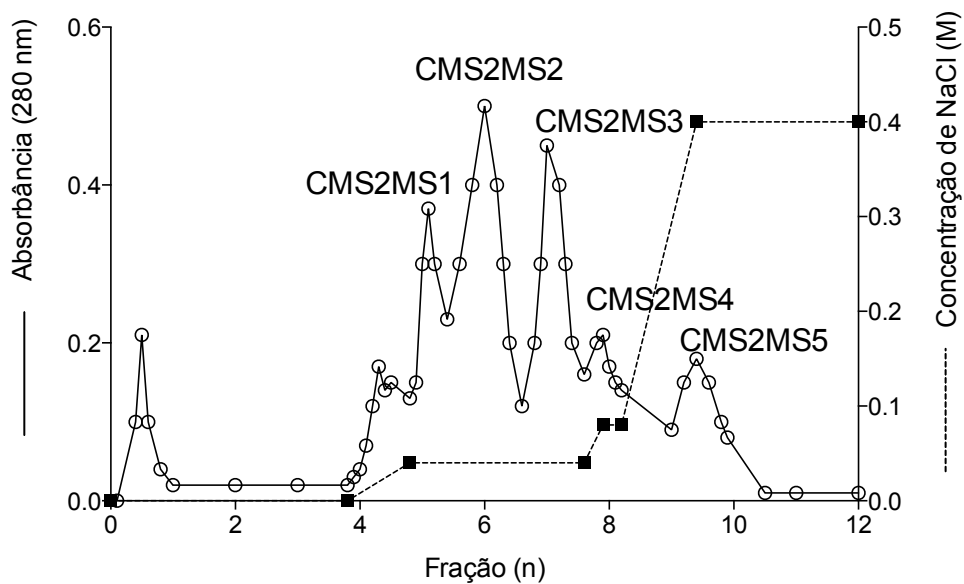


Figura 8. Cromatografia em coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose acoplada ao sistema FPLC. Nesta cromatografia foram aplicados 3 mg de CMS2. As amostras foram eluídas com um gradiente não linear de NaCl, com 5 mM de EDTA e 25 mM de tampão tetraborato de sódio (pH 9,5). O perfil proteico foi medido pela absorbância em 280 nm. A cromatografia foi realizada com fluxo de 1 mL/min. Estão indicados os picos denominados CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5, respectivamente, na ordem de eluição.

Foram aplicados, ao final de vinte cromatografias, 178 mg de CMS2, na coluna Mono-S Sepharose. Após a realização de todas as cromatografias, os picos correspondentes foram agrupados e concentrados por ultrafiltração como descrito na metodologia (item 4.2.1.7). Depois, foi realizada a determinação da concentração

proteica das amostras pelo método de Bradford (descrito no item 4.2.1.9) correspondendo a 0,84; 1,5; 1,25; 0,6 e 1,33 mg/mL para CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 a CMS2MS5, nessa ordem. A quantidade final de todas as proteínas recolhidas após os processos cromatográficos foi de 52 mg, o que corresponde a um rendimento cromatográfico total de 29%.

Posteriormente, a fim de determinar a massa molecular das amostras e avaliar o grau de purificação destas, foi realizada uma eletroforese em condições desnaturantes (item 4.2.1.12). O resultado pode ser observado na Figura 9.

Nas amostras, as bandas de aproximadamente 23 kDa aparecem de modo bem definido, apesar de, em alguns casos, existir uma banda de intensidade mais fraca localizada acima (banda “contaminante”). Essa banda fraca é visualizada principalmente nas frações CMS2MS2, CMS2MS4 e CMS2MS5 (canaletas 3, 5 e 6, respectivamente), correspondendo a aproximadamente 10, 12 e 4%, respectivamente, do total de proteínas nestas canaletas. Esses valores foram abaixo de 2% para os demais picos.

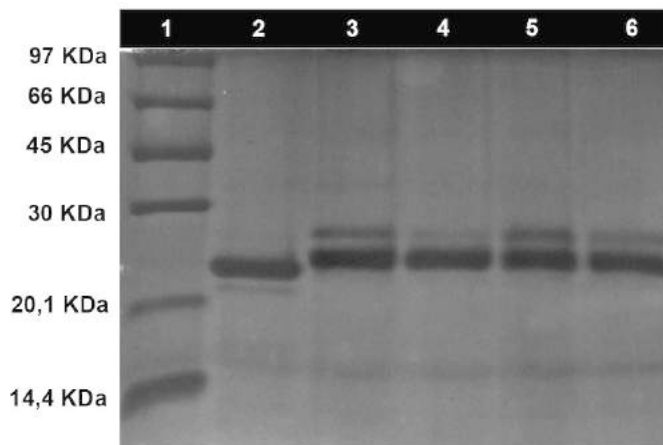


Figura 9. Perfil eletroforético das proteases obtidas na cromatografia em Mono-S Sepharose. Trinta microgramas de cada amostra foram aplicados, sendo a corrida eletroforética e a coloração do gel por Azul-brilhante de Coomassie. Canaleta 1, padrão de peso molecular, canaletas de 2 a 6, amostras de CMS2MS1 a CMS2MS5.

Considerando o total de 52 mg obtidos a partir da cromatografia de CMS2 na coluna Mono-S Sepharose, foi calculado o percentual de cada uma das frações obtidas. CMS2MS1 e CMS2MS5 correspondem aproximadamente 30% da composição, enquanto que as demais representam aproximadamente 13% do total, além de uma atividade amidásica específica (Tabela 1), próximo aos valores descritos por (Gomes, 2008).

Tabela 1 – Quantidade de proteína, proporção e atividade amidásica específica das proteases obtidas após cromatografia em Mono-S Sepharose.

Fração “Mono-S”	Quantidade de proteína (mg)	Proporção (% de CMS2)	Atividade amidásica específica (nM x min ⁻¹ x µg ⁻¹)
CMS2MS1	16,38	32	0,04
CMS2MS2	6,75	13	0,18
CMS2MS3	5,62	11	0,16
CMS2MS4	7,20	14	0,02
CMS2MS5	16,00	31	0,02

Após a cromatografia da sub-fração CMS2 em coluna Mono-S Sepharose, foi determinada a concentração proteica das frações e sua atividade amidásica específica. O cálculo da proporção de cada protease obtida feito considerando o volume aplicado na coluna e a concentração proteica dos eluatos.

5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

A fim de determinar os possíveis mecanismos de ação das proteases CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5, foram realizados experimentos que avaliaram seus efeitos sobre os mecanismos de morte e adesão celular sobre a linhagem de melanoma metastático murino, B16F10. Para a avaliação do efeito dessas proteases sobre a viabilidade celular, também foi utilizada a linhagem não-tumorigênica de melanócito murino, Melan-A.

5.2.1 Efeito das proteases sobre a viabilidade celular

A capacidade de inibição da viabilidade celular por CMS2MS1-5 foi avaliada em células B16F10 e Melan-A. Após exposição, por 72h, às proteases (0,1 - 500 µg/mL), a viabilidade celular foi determinada e, por regressão não linear, calculada a CC-50 (Apêndice A).

Sobre células B16F10, CMS2MS3 foi a protease que promoveu maior inibição da viabilidade (CC-50 de 7,8 µg/mL), seguida por CMS2MS4, CMS2MS2, CMS2MS5 e, por último, CMS2MS1, cuja CC-50 foi de 303,5 µg/mL (Tabela 2). Sobre Melan-A,

CMS2MS3 foi menos potente que em B16F10, com valor de CC-50 de 42,3 µg/mL. As demais tiveram citotoxicidade semelhante ao observado para a B16F10, com CC-50 que variaram entre 49,8 e 303,4 µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Determinação da CC-50 das proteases sobre B16F10 e Melan-A

Proteases	CC-50 (µg/mL)	
	B16F10	Melan-A
CMS2MS1	303,5 ± 1,7 ^a	303,4 ± 5,1 ^a
CMS2MS2	48,6 ± 6,3 ^b	49,8 ± 2,3 ^b
CMS2MS3	7,8 ± 1,2 ^c	42,3 ± 1,2 ^b
CMS2MS4	34,5 ± 15,2 ^b	50,4 ± 3,1 ^{b,d}
CMS2MS5	109,6 ± 2,2 ^{d,e}	131,2 ± 20,9 ^e

As linhagens celulares B16F10 (melanoma murino metastático) ou Melan-A (melanócito murino não-tumorigênico) foram expostas por 72h a concentrações crescentes das frações, sendo a viabilidade celular determinada pela metabolização da resazurina em resofurina (leituras a 570 e 600 nm, respectivamente). As CC-50 foram determinadas após a regressão não-linear dos dados experimentais. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. Médias, na coluna, com pelo menos uma letra distinta diferem entre si pela ANOVA, pós teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Médias, na linha, com pelo menos uma letra igual não diferem entre si pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

5.2.2 Efeito das proteases sobre a desadesão e adesão celular

Com base em observações prévias, quando expostas às proteases, as células perdem sua adesão e têm sua morfologia alterada, sendo assim, foi medida a capacidade das proteases em promover a perda da adesão em células B16F10. Inicialmente, foi avaliado o efeito das proteases sobre a adesão das células em placas de poliestireno, conforme descrito no item 4.2.2.3 da seção de metodologia. Uma diminuição da adesão de células B16F10 foi observada quando tratadas com cada uma das proteases, em níveis variáveis. CMS2MS3 (Figura 10C) foi a que promoveu maior perda da adesão, em todos os tempos avaliados, nas concentrações de 10, 30 e 50 µg/mL, culminando em 24h com 39, 62 e 75% de perda da adesão, respectivamente (ANOVA, pós teste de Bonferroni).

Efeito de magnitude semelhante ao de CMS2MS3 foi observado para CMS2MS2 (Figura 10B), embora apenas nos tempos de 8 e 24h (ANOVA, pós teste de Bonferroni). CMS2MS4 (Figura 10D) foi capaz de promover perda da adesão de B16F10 em todos os tempos analisados, apenas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (ANOVA, pós teste de Bonferroni). Na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, a perda da adesão aconteceu apenas após 24h de tratamento (ANOVA, pós teste de Bonferroni). As proteases CMS2MS1 e CMS2MS5 (Figura 10A e E, respectivamente) promoveram perda da adesão das células tumorais quando tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$, a partir de 24h (ANOVA, pós teste de Bonferroni).

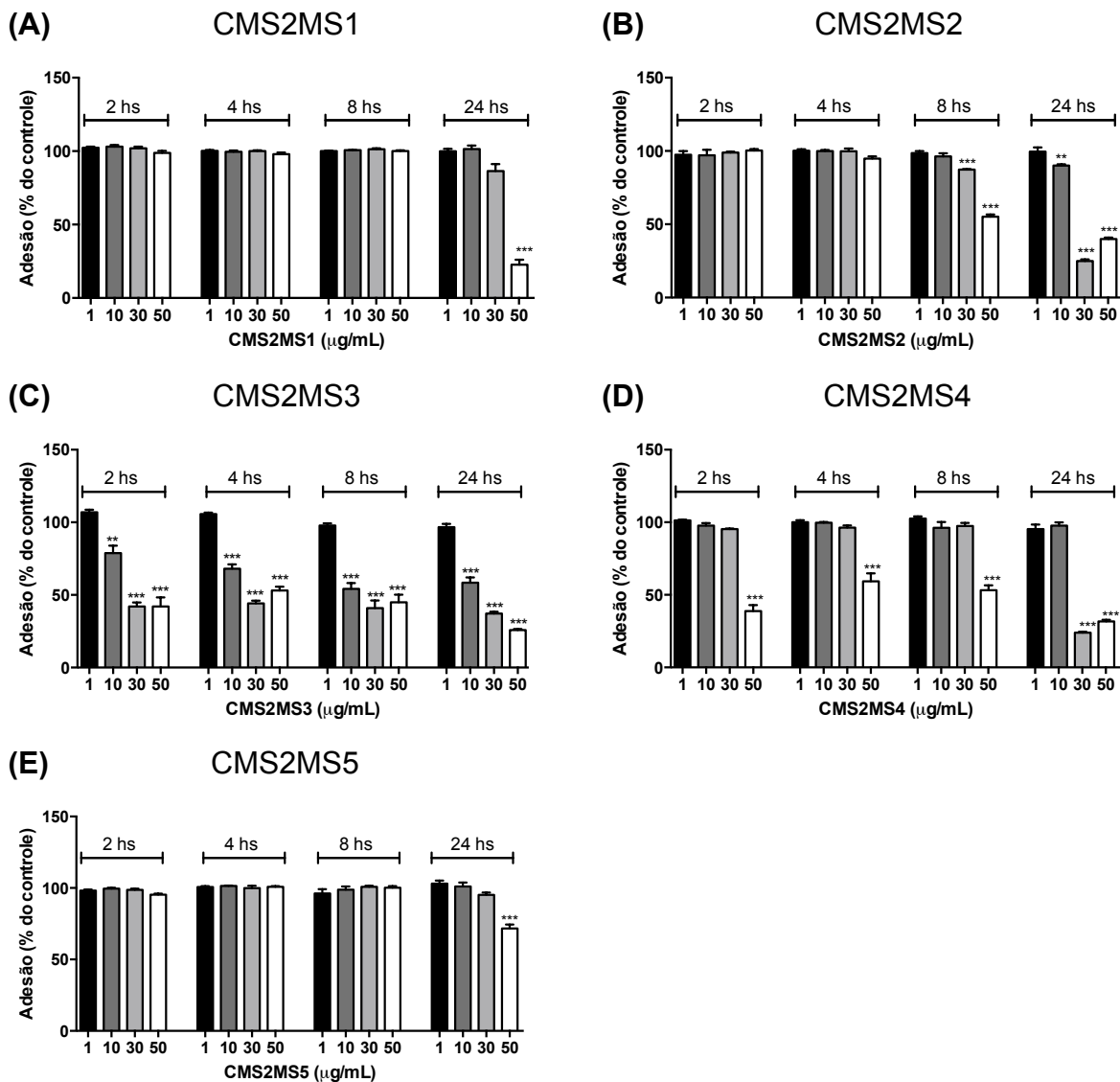


Figura 10. Adesão de células B16F10 a placas de poliestireno. Células da linhagem B16F10 foram tratadas com concentrações crescentes das proteases CMS2MS1 (A), CMS2MS2 (B), CMS2MS3 (C), CMS2MS4 (D) ou CMS2MS5 (E) por 2, 4, 8 ou 24h. O percentual de células aderidas foi determinado pela metabolização da resazurina (leituras a 570 e 600 nm, respectivamente) e normalizadas com o grupo controle (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ANOVA, pós teste de Bonferroni).

Após a determinação do percentual de adesão das células B16F10 tratadas com as proteases, foram medidas a viabilidade das células do sobrenadante, por exclusão do corante Azul de Tripiano, dos grupos tratados com a menor concentração que promoveu a perda da adesão. Assim, foram consideradas as concentrações de 50, 30, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5, respectivamente. Apenas as proteases CMS2MS1 (Figura 11A) e CMS2MS2 (Figura 11B) promoveram uma redução da viabilidade (9% e 12%, respectivamente) estatisticamente significativa (ANOVA, pós teste de Bonferroni) daquelas células presentes no sobrenadante, após 24h de tratamento.

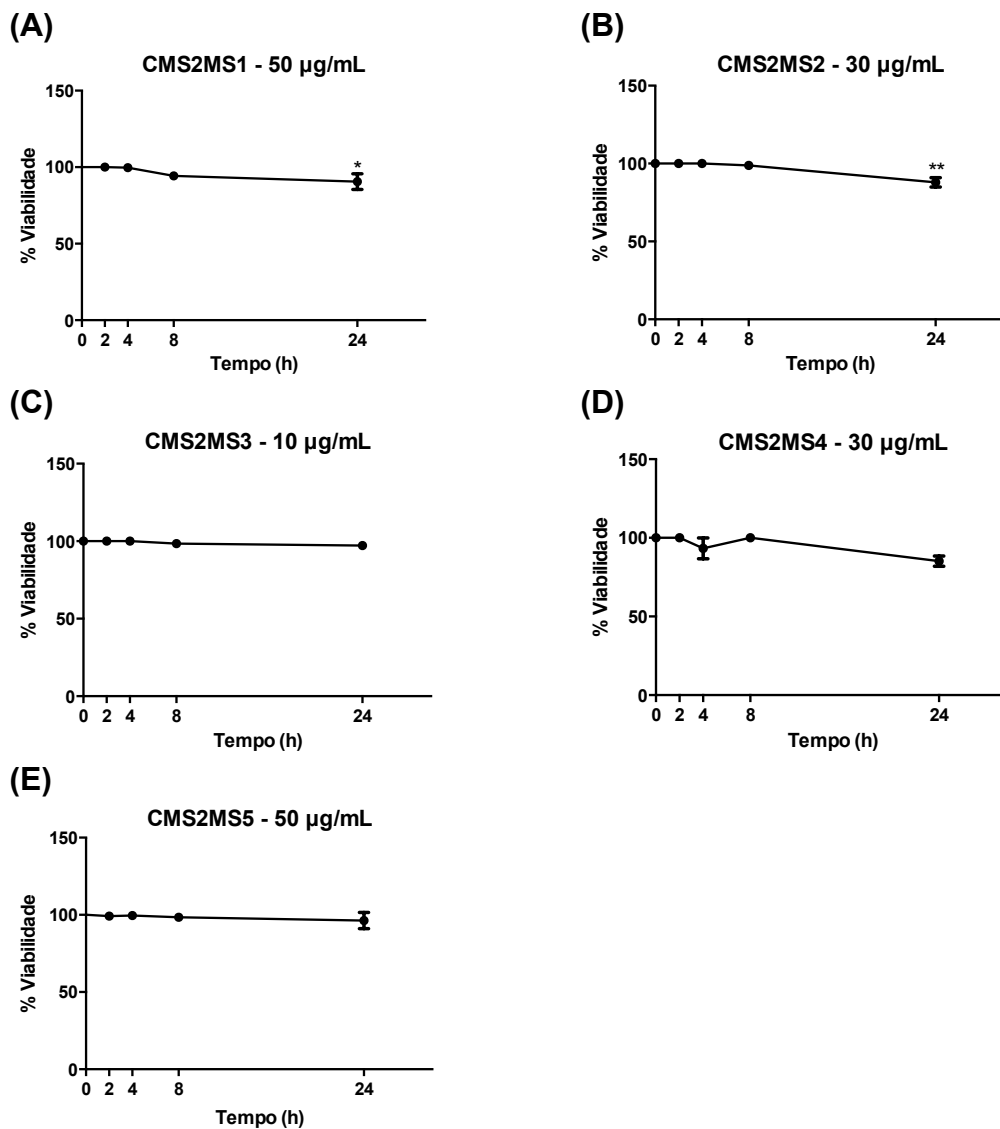


Figura 11. Viabilidade de células do sobrenadante após tratamento com as proteases. Células da linhagem B16F10, após tratamento com as proteases por 2, 4, 8 ou 24h, foram coradas com Azul de Tripiano e tiveram o percentual de viabilidade celular determinado. (A) CMS2MS1 – 50 $\mu\text{g/mL}$, (B) CMS2MS2 – 30 $\mu\text{g/mL}$, (C) CMS2MS3 – 10 $\mu\text{g/mL}$, (D) CMS2MS4 – 30 $\mu\text{g/mL}$ e (E) CMS2MS5 – 50 $\mu\text{g/mL}$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ANOVA, pós teste de Bonferroni).

Considerando os efeitos observados sobre a viabilidade celular e a perda da adesão, a protease CMS2MS3 foi selecionada para os estudos subsequentes. Dessa maneira, optou-se pela realização dos ensaios com CMS2MS3 na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ na qual o efeito sobre a adesão celular é considerável, enquanto que o efeito sobre a viabilidade celular das células que perderam a adesão em até 24h de tratamento com a protease, não teve diferença significativa quando comparado com o controle (Figura 11C).

Com o objetivo de avaliar a capacidade de adesão das células B16F10 após exposição a CMS2MS3, foi utilizado o kit CytoMatrix™ Cell Adhesion Strips (Chemicon®). As células foram expostas, por 2, 4, 8 ou 24h, a 10 $\mu\text{g/mL}$ de CMS2MS3 e, então, semeadas (4×10^4 células) em placas revestidas com diferentes componentes da matriz extracelular (colágeno I, colágeno IV, fibronectina, vitronectina e laminina), permanecendo por 2h em estufa de CO_2 . Ao final da exposição, as células aderidas aos substratos foram coradas com solução de cristal violeta e, através de determinação espectrofotométrica a 570 nm, avaliou-se a adesão destas células aos diferentes componentes da matriz extracelular (Figura 12).

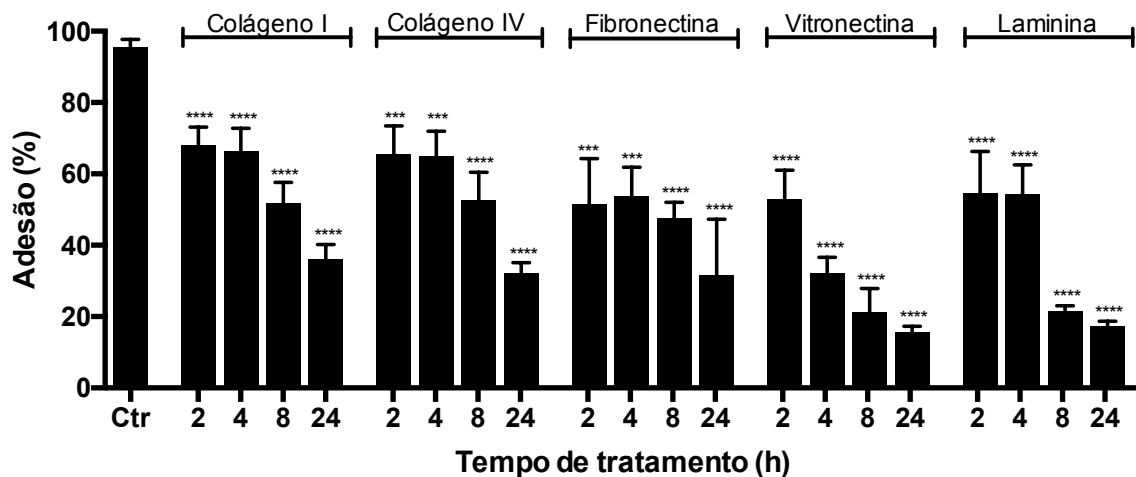


Figura 12. Adesão de B16F10 a diferentes componentes da matriz extracelular. Células B16F10 foram expostas por 2, 4, 8 ou 24h a CMS2MS3 10 $\mu\text{g/mL}$ e, posteriormente, semeadas em placas revestidas com componentes da matriz extracelular. Após 2h de incubação à 37 °C, as células aderidas foram coradas com cristal violeta e a densidade óptica determinada por espectrofotometria a 570 nm. O percentual de células aderidas foi determinado em função do controle (Ctr), considerado com 100% (**p<0,001; ****p<0,0001, ANOVA, pós teste de Bonferroni).

Na Figura 12 é mostrada a adesão, em percentual, comparada ao controle de cada componente da matriz extracelular, definido como 100% de adesão. Observa-

se que as células perderam adesão a todos os componentes da matriz extracelular em todos os tempos analisados, em diferentes proporções, estatisticamente significativas (ANOVA, pós teste de Bonferroni). A adesão ao colágeno I e IV foi reduzida de maneira muito semelhante sendo esta redução de aproximadamente 34% após 2 e 4h de tratamento com a protease. Essa redução foi de 50% e 65% após 8 e 24h, respectivamente. Quando avaliada sobre a fibronectina, a adesão foi reduzida em aproximadamente 50% após 2, 4 e 8h de tratamento, sendo de 70% quando as células foram expostas a CMS2MS3 por 24h. No componente vitronectina, a redução da adesão foi de 50%, 70%, 80% e 86% após 2, 4, 8 e 24h, respectivamente, de tratamento. Finalmente, para o componente laminina, a redução da adesão foi em torno de 50% após 2 e 4h de tratamento com a protease, atingindo níveis em torno de 80% após 8 e 24h de exposição a CMS2MS3.

Como forma de avaliar o número de adesões focais, foi quantificada a vinculina, localizada na porção interior da membrana celular, em células B16F10 tratadas com 10 µg/mL de CMS2MS3 por 2, 4, 8 ou 24h. A Figura 13 mostra, qualitativamente, as alterações observadas como a redução no tamanho das células e arredondamento, em diferentes tempos analisados. Ainda, é possível notar uma diminuição da área total de vinculina (em verde), localizada na membrana celular, indicando uma redução do número de pontos de adesão. Essa redução, conforme mostra a Figura 14, foi de 65% após 2h de tratamento e em mais de 85% quando tratadas por 4, 8 ou 24h (ANOVA, pós teste de Bonferroni).

Dando seguimento ao estudo de CMS2MS3 sobre a adesão de células de melanoma B16F10, foi avaliado seu efeito sobre a expressão fenotípica das subunidades α_4 , α_5 , α_v e β_1 de integrinas. As células de melanoma foram expostas à protease na concentração de 10 µg/mL por 2, 4, 8 ou 24h (Figura 15).

Os resultados mostram que o tratamento com a protease promoveu uma redução nos níveis das duas subunidades α_4 , α_5 e β_1 de integrinas enquanto que para a subunidade α_v não houve alteração significativa. Para a subunidade α_4 , a redução foi de aproximadamente 40% após 2 ou 4h de tratamento enquanto que, após 8h ou 24h essa redução foi de 65% e 93%, respectivamente (ANOVA, pós teste de Bonferroni). Os níveis da subunidade α_5 foram reduzidos apenas após 8 ou 24h de tratamento, alcançando valores de, aproximadamente, 15% (ANOVA, pós teste de Bonferroni). Para a subunidade β_1 a redução foi observada em todos os tempos analisados, sendo de 16%, 8%, 40% e 55% após 2, 4, 8 ou 24h,

respectivamente (ANOVA, pós teste de Bonferroni).

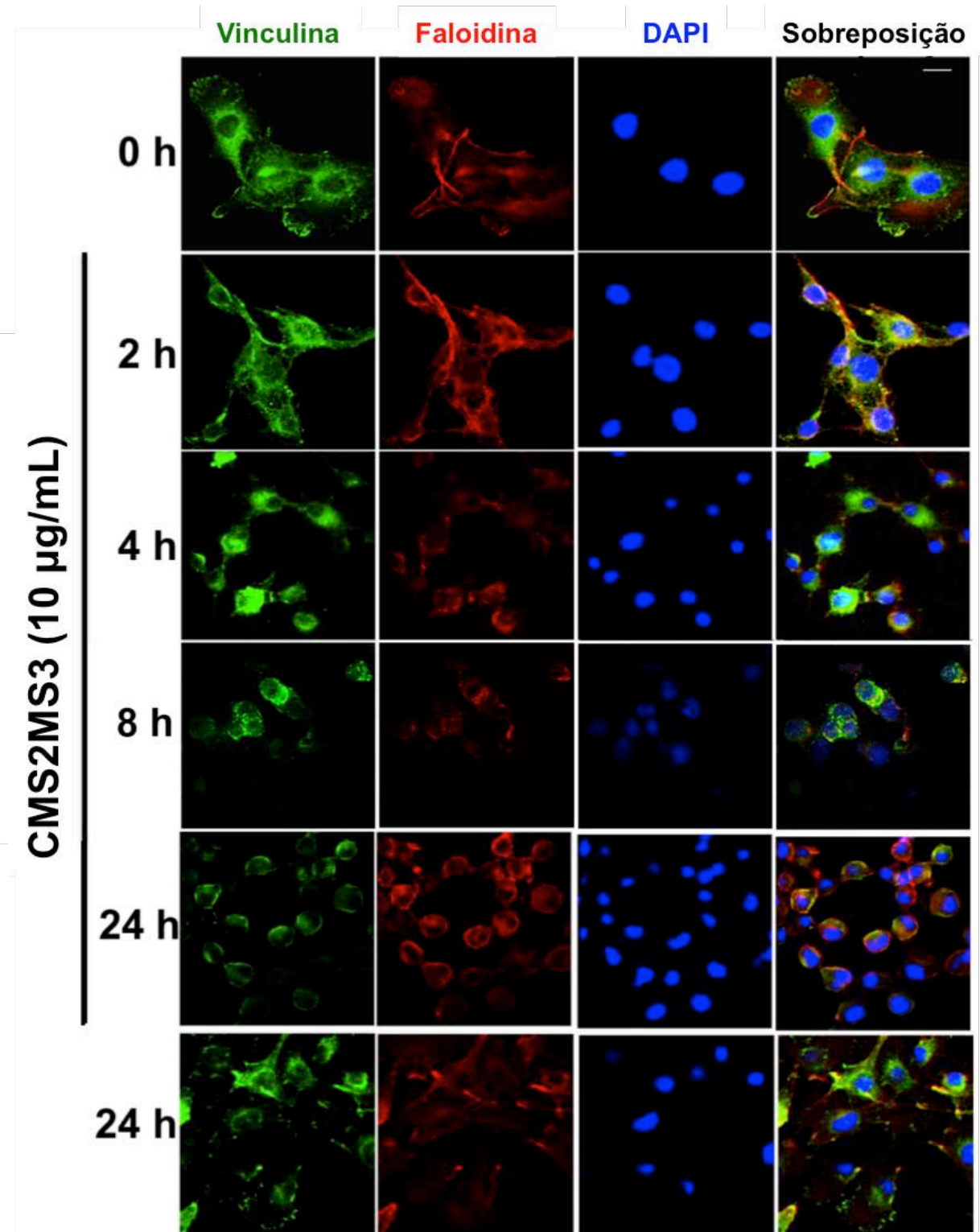


Figura 13. Alterações morfológicas em células B16F10 tratadas com CMS2MS3. Após tratamento com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CMS2MS3 por 2, 4, 8 e 24 h, as células foram marcadas com anticorpos anti-vinculina (em verde, para vinculina), faloidina conjugada com TRITC (em vermelho, para actina F) e DAPI (em azul, para núcleo). As imagens foram obtidas por microscopia confocal.

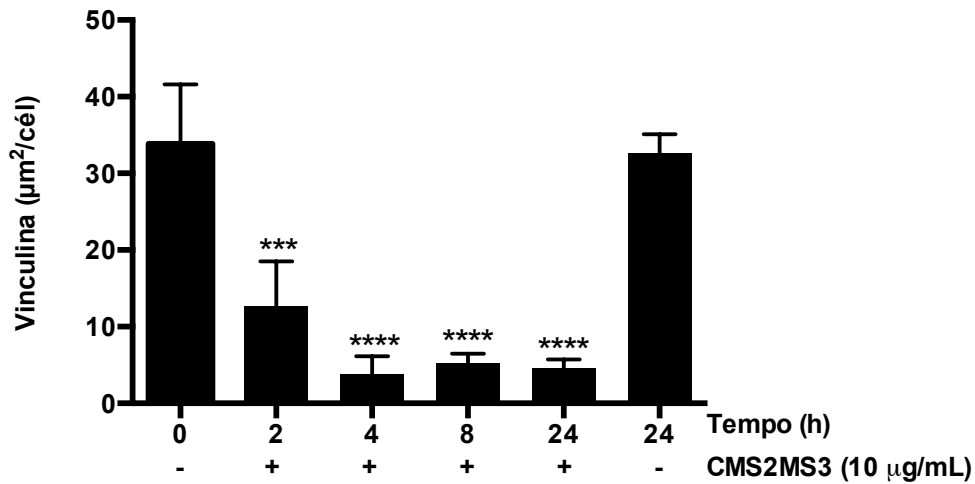


Figura 14. Área absoluta de vinculina na membrana por célula. Células B16F10, plaqueadas em lamínulas, foram tratadas com CMS2MS3 (10 µg/mL). Ao final, foi realizada imunofluorescência para marcação de vinculina (anti-vinculina-FITC), actina F (faloidina-TRITC) e núcleo (DAPI) celular. A determinação da área de vinculina foi feita através do software ImageJ (***) $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, ANOVA, pós teste de Bonferroni).

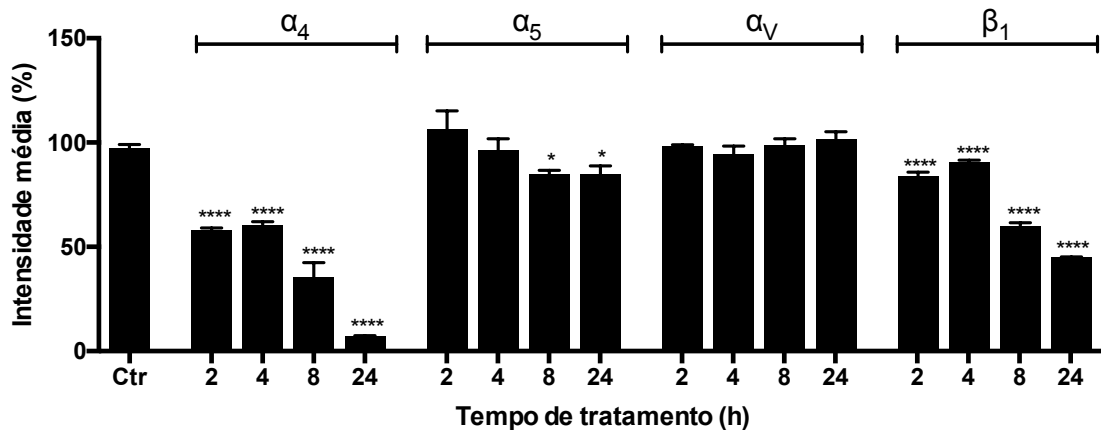


Figura 15. Expressão fenotípica de subunidades de integrina em células B16F10 tratadas com CMS2MS3. Células B16F10 tratadas ou não com 10 µg/mL de CMS2MS3 foram marcadas com anticorpos anti-integrina α_4 e anti-integrina α_5 , conjugados com FITC, anti-integrina α_V e anti-integrina β_1 , conjugados com PE ou IgG isotipo conjugado com FITC ou PE, para seus respectivos controles e analisadas por citometria de fluxo. O percentual da intensidade média de cada grupo foi calculado considerando os controles como 100%. Os dados são representativos de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$; ANOVA, pós teste de Bonferroni).

A Figura 16, representativa da expressão fenotípica das subunidades de integrina após o tratamento com CMS2MS3, mostra um padrão de desvio à esquerda do histograma em verde, comparado ao controle (em azul), quando há uma diminuição dos níveis das subunidades α_4 , α_5 , α_V e β_1 .

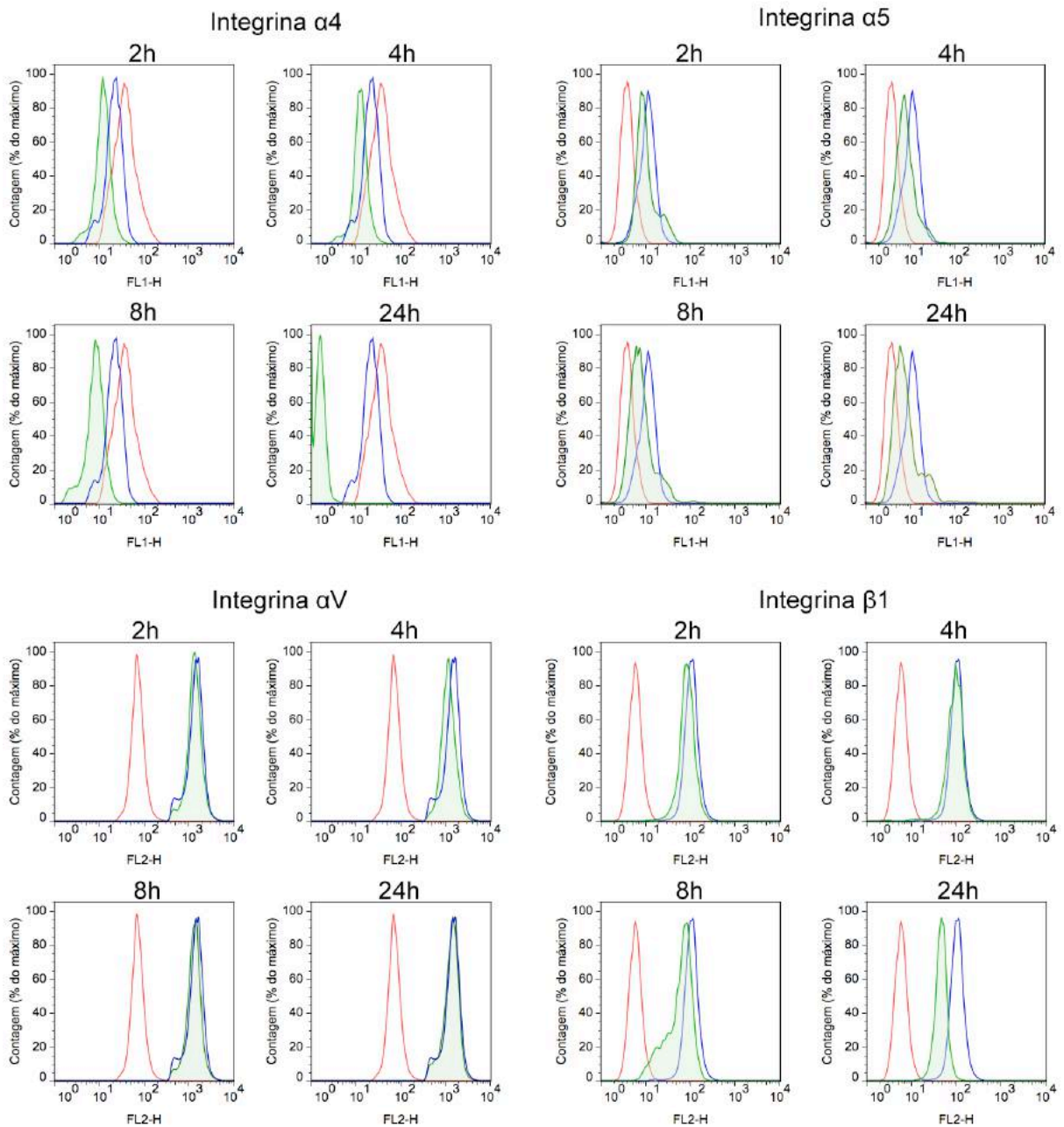


Figura 16. Perfil da expressão fenotípica de subunidades de integrina em células B16F10 tratadas com CMS2MS3. Células B16F10 tratadas (em verde) ou não (em azul) com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CMS2MS3 foram marcadas com anticorpos anti-integrina α_4 e anti-integrina α_5 , conjugados com FITC (leitura no canal FL1-H), anti-integrina α_V e anti-integrina β_1 , conjugados com PE (leitura no canal FL2-H) ou IgG isotipo conjugado com FITC ou PE, para seus respectivos controles (em vermelho) e analisadas por citometria de fluxo. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

5.2.3 Efeito da protease sobre a fragmentação do DNA

Inicialmente, para a avaliação do efeito de CMS2MS3 sobre o DNA de células B16F10, foi realizado um gel de agarose das células tratadas com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da

protease por 2, 4, 8 ou 24h. De acordo com o perfil das bandas mostrado na Figura 17, o tratamento das células B16F10 com 10 $\mu\text{g/mL}$ de CMS2MS3 não promoveu fragmentação no DNA nos tempos analisados, com padrões de corrida semelhantes aos observados para os controles de 0 e 24h.

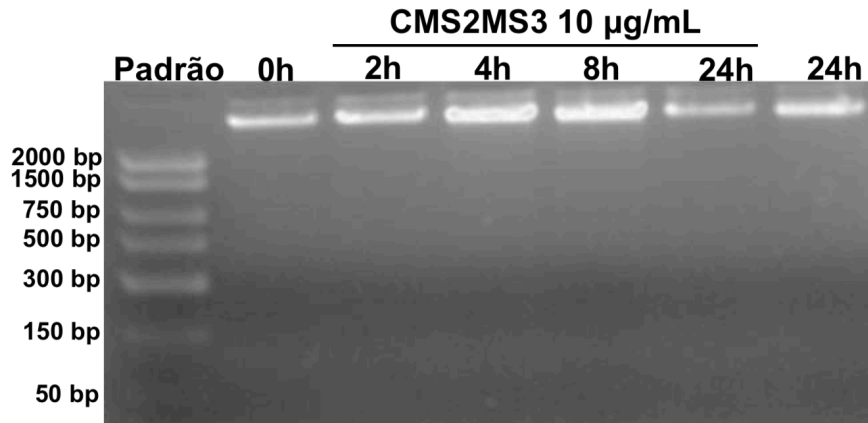


Figura 17. Eletroforese de DNA de células B16F10 tratadas com CMS2MS3. O DNA de células B16F10 tratadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de CMS2MS3 por 2, 4, 8 ou 24h e de células controle (0 e 24h) foi extraído e submetido a corrida eletroforética em gel de agarose. Após a corrida, a obtenção da imagem para a visualização do perfil das bandas foi feita em transiluminador de luz ultravioleta.

Com o intuito de avaliar se concentrações maiores que 10 $\mu\text{g/mL}$ de CMS2MS3 alterariam esse perfil, as células foram expostas por 2, 4, 8 ou 24h a 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da protease. CMS2MS3, nas concentrações de 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ não promoveu fragmentação do DNA das células B16F10, em níveis superiores ao controle, em todos os tempos analisados. No entanto, quando tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de CMS2MS3, houve aumento de 2 e 4 vezes (ANOVA, pós teste de Bonferroni) para os tempos de 8 e 24h, respectivamente (Figura 18).

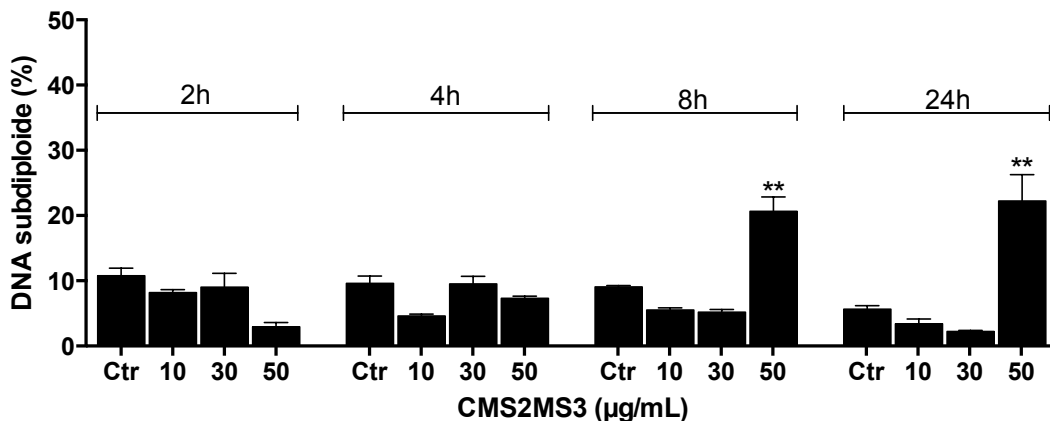


Figura 18. Fragmentação do DNA de células B16F10 tratadas com CMS2MS3. As células foram tratadas com concentrações crescentes de CMS2MS3 por 2, 4, 8 ou 24h. Ao final, os núcleos foram marcados com iodeto de propídio (PI) e o conteúdo de DNA analisado por citometria de fluxo (** $p < 0,01$, ANOVA, pós teste de Bonferroni).

5.2.4 Efeito de CMS2MS3 sobre a apoptose

A fim de avaliar o efeito da protease sobre a indução da morte celular por apoptose, as células de B16F10 foram expostas a 10 µg/mL de CMS2MS3 por 2, 4, 8 ou 24h. A partir do lisado celular, foi determinada, por Western Blot, a quantidade de Caspase 3 e seu fragmento ativo (*cleaved caspase 3*), Caspase 9 e GAPDH, este último como controle interno (Figura 19).

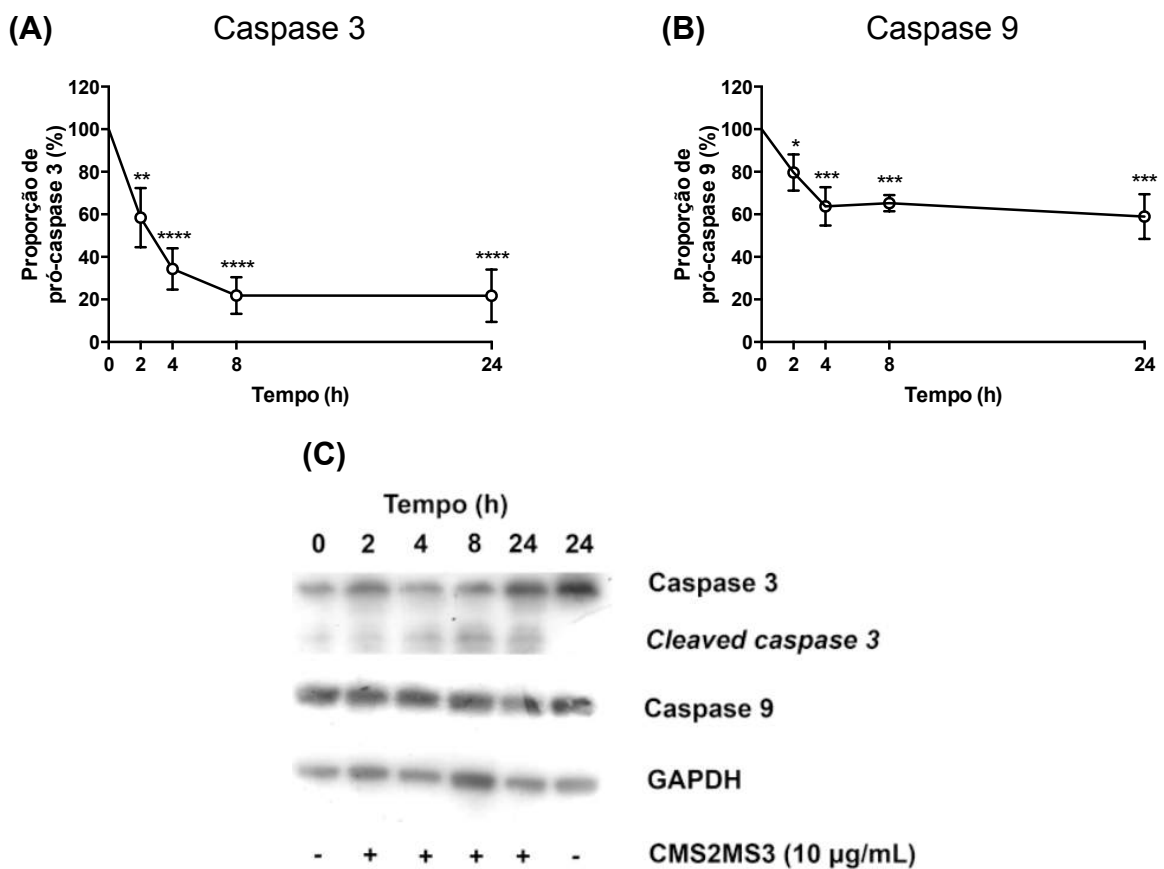


Figura 19. Efeito de CMS2MS3 sobre proteínas indicadoras da via apoptótica. Foram aplicados 30 µg do lisado celular em todas as canaletas, e as eletroforeses realizada em SDS-PAGE. A determinação da proporção, após Western Blot, entre (A) pró-caspase 3 e fragmento seu fragmento ativo (*cleaved caspase 3*) e (B) pró-caspase 9 foi obtida por densitometria das bandas realizada pelo software ImageJ. Em (C), representação das bandas para as diferentes proteínas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ANOVA, pós teste de Bonferroni).

A protease CMS2MS3 foi capaz de reduzir a proporção entre Caspase 3 e o seu fragmento ativo em 42 e 66% (ANOVA, pós teste de Bonferroni) nos tempos de 2 e 4h, respectivamente, de tratamento, alcançando uma redução de 78% em 8 e 24h (ANOVA, pós teste de Bonferroni, Figura 19A). A proporção de Caspase 9, comparada ao normalizador GAPDH, também foi reduzida após tratamento com a

protease em 20, 36, 35 e 40% (ANOVA, pós teste de Bonferroni) nos tempos de 2, 4, 8 e 24h, respectivamente (Figura 19B).

A apoptose também foi avaliada por meio da marcação com anticorpo anti-Anexina V conjugado com FITC e iodeto de propídio (PI). Nesse experimento, as células B16F10 foram tratadas com CMS2MS3 na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 2, 4, 8, 24 ou 48h ou com o citotóxico estaurosporina 1 μM , por 3h, como controle positivo de morte por apoptose. Ao final do tratamento, as células foram marcadas e analisadas por citometria de fluxo (Figura 20).

O tratamento de células B16F10 com CMS2MS3 na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não promoveu aumento no número de células apoptóticas, quando comparado ao controle negativo (células sem tratamento), após 2, 4 ou 8h de exposição, mas sim quando foram expostas por 24 ou 48h (5% e 20%, respectivamente). O controle positivo, estaurosporina 1 μM , promoveu um aumento no número dessas células em 55% (Figura 20). De acordo com a Figura 21, as células apoptóticas se localizam no quadrante inferior direito, onde exibem alta intensidade de fluorescência para a Anexina V-FITC e baixa intensidade de fluorescência para o PI.

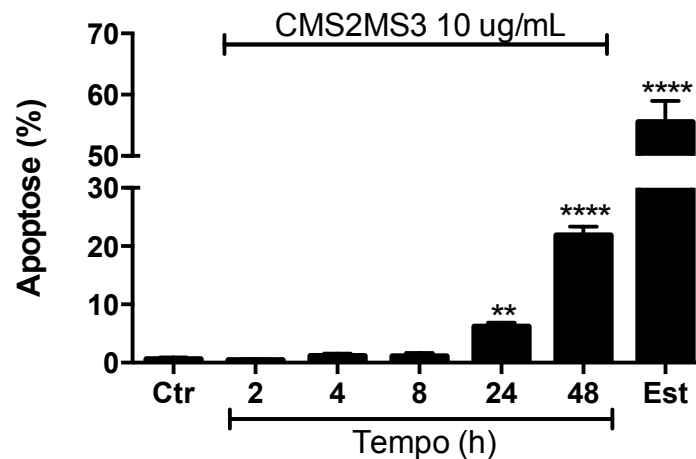


Figura 20. Percentual de células apoptóticas. Células B16F10 foram expostas a CMS2MS3 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 2, 4, 8, 24 ou 48h ou com o citotóxico estaurosporina (Est) 1 μM , por 3h. Ao final, foram marcadas com anticorpo anti-Anexina V-FITC e PI. A fluorescência foi adquirida em citômetro de fluxo FACScan, BD. Foi calculado o percentual de células positivas para Anexina V, sendo estas consideradas como apoptóticas (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$, ANOVA, pós teste de Bonferroni).

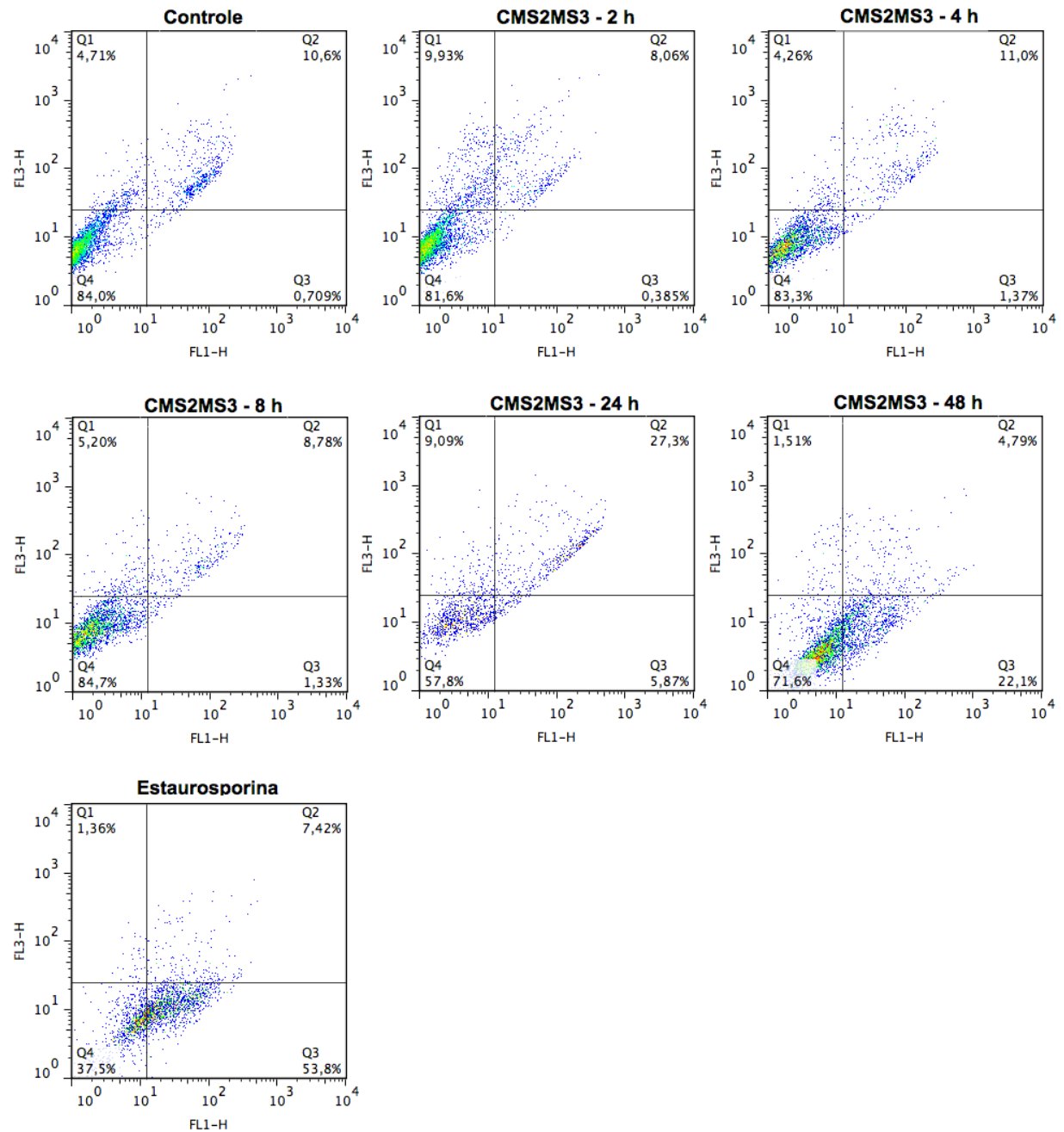


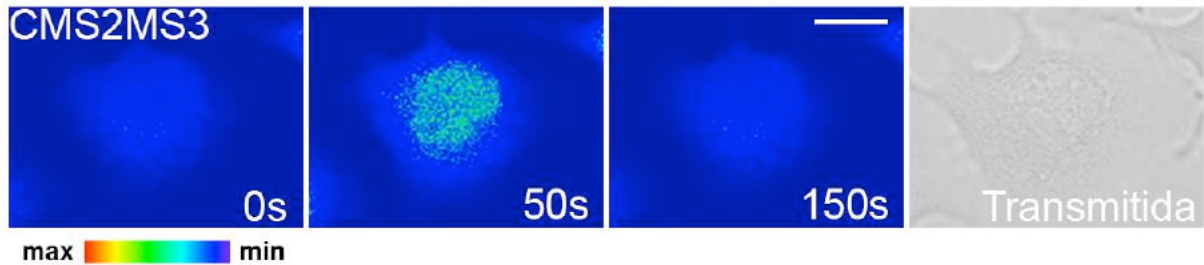
Figura 21. Marcação com Anexina V-FITC e PI em células B16F10 tratadas com CMS2MS3. Células B16F10 foram expostas a CMS2MS3 10 µg/mL por 2, 4, 8, 24 ou 48h ou com o citotóxico estaurosporina 1 µM, por 3h. Ao final, foram marcadas com anticorpo anti-Anexina V-FITC (leitura no canal FL1-H) e PI (leitura no canal FL2-H). A fluorescência foi adquirida em citômetro de fluxo FACScan, BD e representadas graficamente (Dot Plot).

5.2.5 Fluxo de Ca^{2+} em células B16F10 tratadas com CMS2MS3

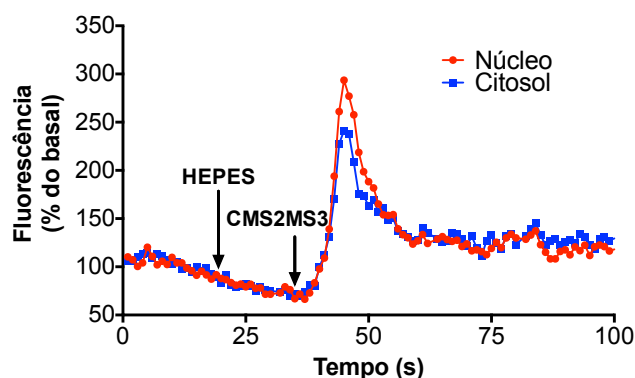
A avaliação do fluxo de Ca^{2+} entre o citoplasma e o núcleo de células B16F10, após o tratamento com CMS2MS3 10 µg/mL foi feita por microscopia confocal, após

a incorporação da sonda fluo-4/AM, seletiva para Ca^{2+} a qual, quando se liga a este íon, emite uma fluorescência captada na região de 520-550 nm (verde) (Figura 22).

(A)



(B)



(C)

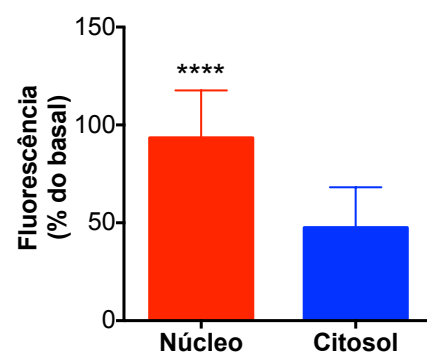


Figura 22. Fluxo de Ca^{2+} nuclear e citoplasmático em células B16F10 expostas à CMS2MS3. As células B16F10 foram marcadas com Fluo-4/AM e, 40min depois, expostas a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CMS2MS3. A fluorescência emitida pelo marcador, quando associado ao Ca^{2+} , foi captada por microscopia confocal, sendo quantificada na região nuclear e citoplasmática com auxílio dos softwares Examiner (Carl Zeiss) e Spectralyzer. (A) Imagem representativa da fluorescência emitida; (B) Relação temporal da fluorescência nuclear e citoplasmática, em resposta aos níveis de Ca^{2+} nesses compartimentos e (C) Fluorescência máxima emitida no núcleo e citoplasma, em resposta aos níveis de Ca^{2+} no compartimento nuclear e citoplasmático ($****p < 0,0001$, ANOVA, pós teste de Bonferroni).

Como mostrado na Figura 22A, existe um aumento na fluorescência, emitida na região do núcleo e do citoplasma, capturada após 50s de aquisição. Esse aumento de fluorescência ocorre após a exposição das células B16F10 à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CMS2MS3, iniciando-se tão logo a protease é adicionada ao meio (aproximadamente 35s após o início da aquisição), sendo máxima no tempo de 50s. A fluorescência retorna a valores próximos ao basal após aproximadamente 60s de aquisição. A fim de excluir um possível aumento da fluorescência por uma ação mecânica durante a adição de CMS2MS3, foi adicionado, após 20s do início da aquisição, solução HEPES, observando-se que não houve alteração na quantidade de fluorescência emitida em função deste estímulo (Figura 22B). Após a correção dos valores de fluorescência nos 50s em função da fluorescência basal, observou-se que a fluorescência máxima emitida na região do núcleo, após a adição de

CMS2MS3 foi 40% maior que no citoplasma, indicando uma maior mobilização do Ca^{2+} para a região nuclear (Figura 22C). Após a transfecção de células B16F10 com a sonda Mitycam, que identifica o Ca^{2+} mitocondrial, o efeito de CMS2MS3 no fluxo deste íon foi quantificado. Essa sonda emite fluorescência verde, tendo essa emissão reduzida quando há ligação ao Ca^{2+} (Figura 23).

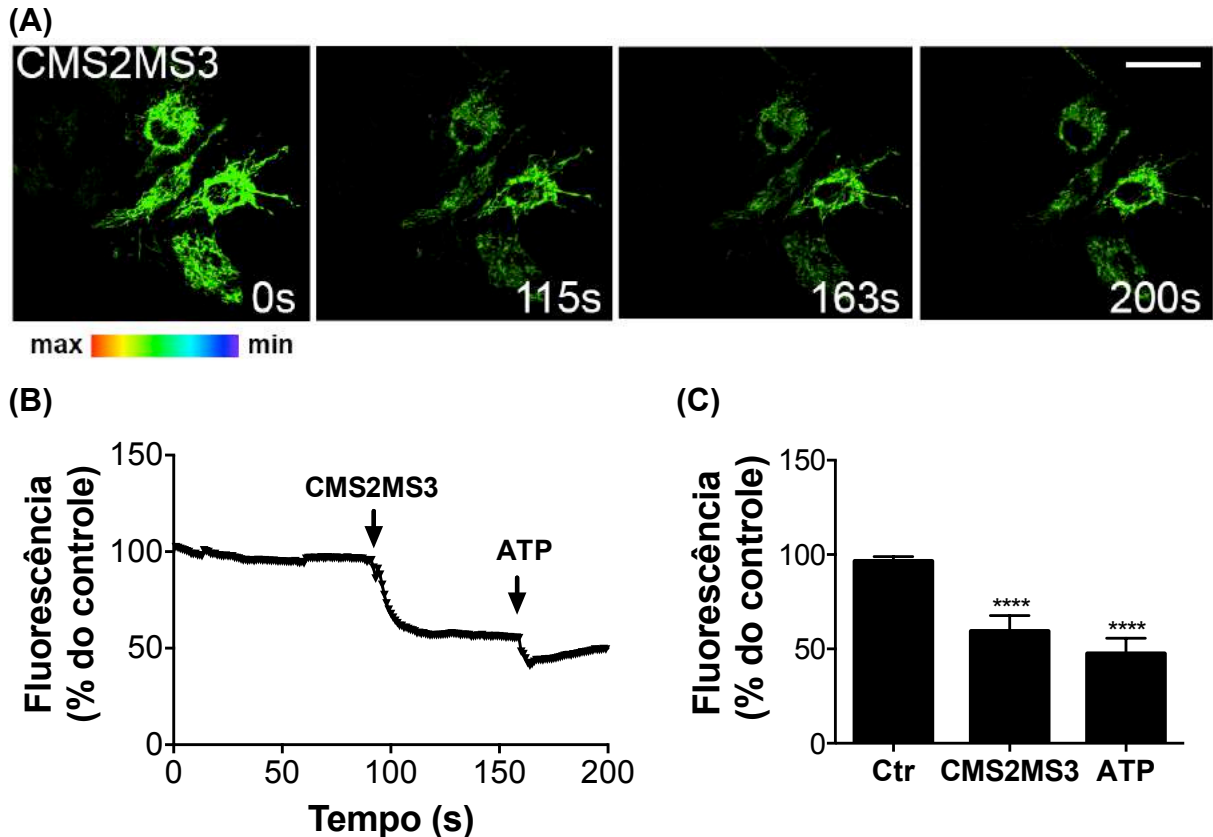


Figura 23. Fluxo de Ca^{2+} mitocondrial em células B16F10 expostas a CMS2MS3. As células B16F10 foram transfectadas para expressar, nas mitocôndrias, uma sonda fluorescente para Ca^{2+} (Mito Inverse-Pericam) e, então, expostas a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CMS2MS3. A fluorescência emitida pelo marcador, quando associado ao Ca^{2+} foi captada por microscopia confocal, sendo quantificada com auxílio dos softwares Examiner (Carl Zeiss) e Spectralyzer. (A) Imagem representativa da fluorescência emitida; (B) Imagem representativa da relação temporal da fluorescência, em resposta aos níveis de Ca^{2+} mitocondrial; (C) Fluorescência emitida na mitocôndria, em resposta aos níveis de Ca^{2+} na presença de CMS2MS3 ou ATP (**** $p < 0,0001$, ANOVA, pós teste de Bonferroni).

Como mostrado na Figura 23A, ocorre uma redução máxima na fluorescência emitida na mitocôndria das células transfectadas após a adição de CMS2MS3 (115s) e ATP (163s) sendo que, após 200s de aquisição, observou-se um discreto aumento na fluorescência emitida. A fim de excluir um possível aumento da fluorescência por uma ação mecânica durante a adição de CMS2MS3, foi adicionado, após 20s do início da aquisição, solução HEPES, observando-se que não houve alteração na

quantidade de fluorescência emitida em função desse estímulo (Figura 23B). A redução da fluorescência teve início tão logo as células foram expostas à CMS2MS3 (100s), havendo uma redução de 40% em relação aos valores iniciais. A redução foi máxima no tempo de 115s, quando permaneceu reduzida até a adição de ATP (150s). Nesse momento, houve uma rápida redução da fluorescência, culminando em 52% em relação ao controle, no tempo de 163s (Figura 23B e 23C).

5.2.6 Indução de metástases pulmonares após tratamento de células B16F10 com CMS2MS3

A capacidade de colonização pulmonar das células B16F10 por meio da injeção caudal de células tratadas (*in vitro*) com 10 $\mu\text{g/mL}$ de CMS2MS3 por 2, 8 ou 24h foi avaliada no 15^o dia após o inóculo. A redução do número de colônias pulmonares foi observada em todos os grupos que receberam as células tratadas com a protease (Figura 24). Nos animais que receberam as células após 2, 8 ou 24h de tratamento foi observada uma redução de 65, 85 e 95% (ANOVA, pós teste de Bonferroni) no número de colônias pulmonares, comparados ao grupo 0h (controle). Não houve diferença significativa quando comparados os grupos controle e 24h sem tratamento (Figura 25A). A redução do número de colônias foi acompanhada da diminuição da massa dos pulmões dos animais (Figura 25B), que correspondeu a 30, 45 e 48% após 2, 8 e 24, respectivamente (ANOVA, pós teste de Bonferroni), comparado ao grupo controle. Nesse caso, não houve diferença estatisticamente significativa para o grupo que recebeu as células após 24 h, sem tratamento com a protease.

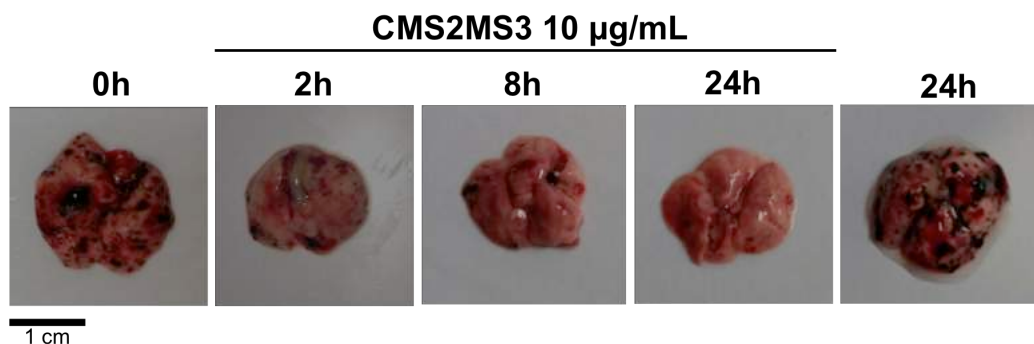


Figura 24. Pulmões colonizados por células B16F10. Células B16F10 tratadas ou não, *in vitro*, com 10 $\mu\text{g/mL}$ de CMS2MS3 por 2, 8 ou 24h, tiveram sua viabilidade determinada por exclusão do corante Azul de Tripano. Em seguida, células viáveis, na densidade de 5×10^5 células/100 μL foram injetadas na veia caudal de camundongos C57Bl6. Após 15 dias, os animais foram sacrificados e, então, determinado o número colônias pulmonares.

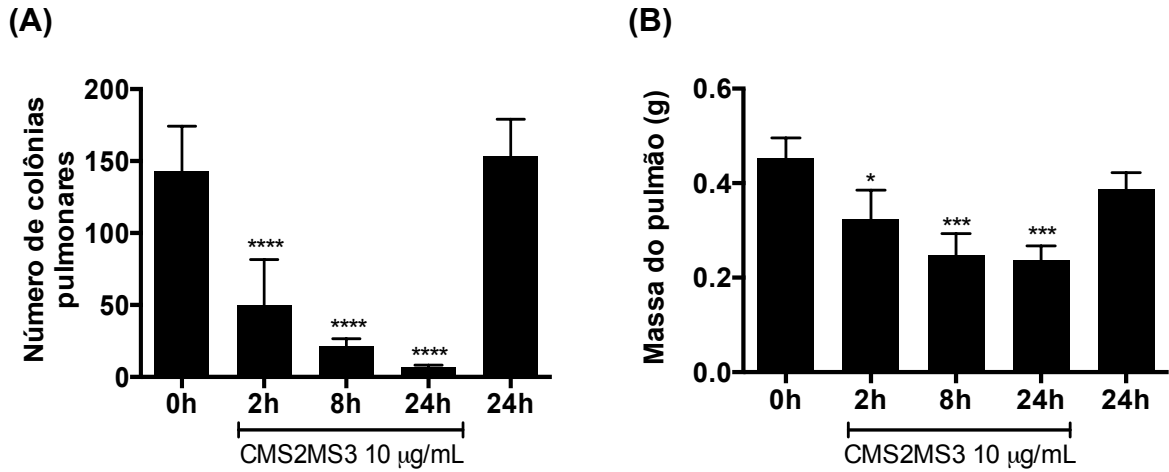


Figura 25. Número de colônias de células B16F10 e peso dos pulmões. Células B16F10 tratadas ou não, in vitro, com 10 µg/mL de CMS2MS3 por 2, 8 ou 24h, tiveram sua viabilidade determinada por exclusão do corante Azul de Tripano. Em seguida, células viáveis, na densidade de 5×10^5 células/100 µL foram injetadas na veia caudal de camundongos C57Bl6 (n = 5 animais/grupo). Após 15 dias, os animais foram sacrificados e, então, determinado o número colônias pulmonares (A) e a massa dos pulmões (B) (*p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001, ANOVA, pós teste de Bonferroni).

6 DISCUSSÃO

Na última década, nosso grupo de pesquisa tem-se dedicado ao estudo bioquímico e das propriedades farmacológicas de cisteíno proteases do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*. As técnicas de obtenção e caracterização das frações proteolíticas do látex foram estabelecidas e descritas por Teixeira *et al.* (2008), servindo como parâmetro para as obtenções subsequentes destas frações. Dentre as propriedades farmacológicas das frações, destacam-se o efeito antitumoral e antimetastático observado em diferentes modelos murinos. A primeira fração proteolítica do látex, P1G10, possui atividades antimoral e antimetastática em modelos murinos de melanoma, cólon, mama e Ehrlich (Viana, 2010; Dittz, 2011; Braga, 2013; Dittz *et al.*, 2015). Duas sub-frações de P1G10, denominadas CMS1 e CMS2, também tiveram seus efeitos antimetastáticos avaliados em tumores murinos de melanoma e cólon mostrando que em apenas uma delas (CMS2) este efeito se manteve (Dittz, 2011). Os efeitos antitumorais e antimetastáticos das frações de *V. cundinamarcensis* são, em parte, por uma ativação do sistema imune (Viana, 2010; Braga, 2013), inibição da angiogênese, citotoxicidade e diminuição da adesão e invasão celular (Dittz, 2011; Dittz *et al.*, 2015). A fim de identificar qual ou quais proteases da sub-fração CMS2, bem como os mecanismos celulares, que estariam envolvidos no efeito antimetastático sobre melanoma murino, deu-se início à obtenção e caracterização frações.

A primeira fração proteolítica do látex de *V. cundinamarcensis*, P1G10, foi obtida por cromatografia em coluna de gel filtração Sephadex G-10, cujo perfil cromatográfico é mostrado na Figura 5. A fração P1G10 possui atividade amidásica superior à segunda fração, P2G10, sendo vinte e duas vezes maior quando comparadas as suas atividades amidásicas específicas. Além disso, a fração P1G10 foi caracterizadas por meio de eletroforese em condições desnaturantes onde foi observado que o produto de várias cromatografias diferentes apresentaram o mesmo perfil proteico (Figura 6). Conforme descrito por Teixeira *et al.* (2008), a fração P1G10 possui, aproximadamente, doze isoformas de cisteíno proteases, cuja etapa subsequente de separação é realizada em coluna de troca iônica, CM Sephadex C-25.

Nessa etapa, os sítios catalíticos das enzimas que compõem P1G10 foram inibidos reversivelmente com pOHMB, a fim de impedir a auto-degradação das proteases durante a eluição. Como observado na Figura 7, houve a separação de dois picos proteicos principais, nomeados de acordo com a ordem de eluição como CMS1 e CMS2. A atividade amidásica específica da sub-fração CMS1 foi cerca de três vezes maior quando comparada à CMS2, sendo esta diferença também descrita por (Gomes, 2008).

A sub-fração CMS2 foi, então, submetida a uma purificação em coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose acoplada ao sistema FPLC (Figura 8) onde foi possível a separação de cinco picos, denominados CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5, de acordo com a ordem de eluição. A fim de determinar o peso molecular e o grau de purificação desses picos proteicos, foi realizada uma eletroforese em condições desnaturantes (Figura 9). Nas amostras, as bandas de aproximadamente 23 kDa aparecem de modo bem definido, apesar de em alguns casos existir uma banda de intensidade mais fraca (banda “contaminante”), de aproximadamente 25 kDa, visualizada principalmente nas frações CMS2MS2, CMS2MS4 e CMS2MS5. Como descrito por Gomes (2008), a presença dessa banda contaminante foi observada em todas as cromatografias realizadas na coluna Mono-S Sepharose. A presença de isoformas proteicas que são dificilmente separadas por eletroforese ou cromatografias de fase normal (troca catiônica, especificamente nesse caso) já foi relatada no látex da família Caricaceae (Kyndt *et al.*, 2007). Nesse caso, as isoformas denominadas CC-Ia e CC-Ib presentes na fração CC-I, só foram isoladas após cromatografia em fase reversa com uma coluna C18 acoplada ao HPLC (Walraevens *et al.*, 1999).

A atividade amidásica específica dessas frações mostrou um padrão semelhante ao descrito por Gomes (2008), onde se observou que as frações CMS2MS2 e CMS2MS3 possuem maior atividade amidásica específica. A partir do volume de CMS2 aplicado na Mono-S Sepharose e da concentração proteica das frações obtidas, foi calculada a proporção das proteases que compõem CMS2 (Tabela 1). Observou-se que os componentes majoritários da sub-fração CMS2 correspondem à CMS2MS1 (30%) e CMS2MS5 (28%). A determinação da massa molecular de CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5 foi feita por Gomes (2008) por espectrometria de massa, confirmando o resultado inicial indicado pela eletroforese no qual estas enzimas possuem massa molecular próxima

de 23 kDa. Essas massas moleculares estão dentro dos valores encontrados para outras cisteíno proteases anteriormente descritas em *V. cundinamarcensis*, as quais variam de 22,9 kDa [CC-Ib (Walraevens *et al.*, 1999)] a 28 kDa [CC28 (Gravina De Moraes *et al.*, 1994)].

Após a obtenção de quantidades suficientes de CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5, passamos a avaliar a atividade citotóxica destas proteases sobre células de melanoma metastático murino (B16F10) e células não tumorigênicas de melanócito murino (Melan-A). Essas linhagens foram expostas por 72h a diferentes concentrações das proteases (0,1 - 500 µg/mL), sendo, então, determinados os valores de CC-50 para cada uma delas (Tabela 2 e Anexo A). Sobre as células B16F10, CMS2MS3 foi a protease que promoveu maior inibição da viabilidade (CC-50 de 7,8 µg/mL), seguida por CMS2MS4, CMS2MS2, CMS2MS5 e, por último, CMS2MS1, cuja CC-50 foi de 303,5 µg/mL. Nas células Melan-A, CMS2MS3 foi menos potente que em B16F10, com valor de CC-50 de 42,3 µg/mL. As demais tiveram citotoxicidade semelhante àquelas observadas para a B16F10, com CC-50 que variaram entre 49,8 e 303,4 µg/mL.

De acordo com o descrito na literatura, podemos considerar CMS2MS3 como citotóxica, uma vez que extratos de plantas não purificados com valores de CC-50 inferiores a 20 µg/mL são considerados ativos enquanto que, para compostos puros, o efeito citotóxico é considerado quando o valor de CC-50 é inferior a 4 µg/mL, o que corresponde a aproximadamente 10^{-6} M (Rieser *et al.*, 1996; Mahavorasirikul *et al.*, 2010). Os valores encontrados para as frações menos purificadas do látex de *V. cundinamarcensis*, sobre melanoma B16F10 foram de 0,5 µg/mL (P1G10), 479 µg/mL (CMS1) e 10,5 µg/mL (CMS2) mostrando possuir um efeito citotóxico sobre esta linhagem apenas as frações P1G10 e CMS2. Em linhagens não tumorigênicas de epitélio de ovário de hamster chinês (CHO) e fibroblasto de rim de hamster chinês (BHK-21), CMS2 possui valores de CC-50 maiores que 400 µg/mL não sendo, portanto, citotóxica (Dittz, 2011).

A existência de um mecanismo seletivo para células tumorais é a forma ideal para o tratamento das neoplasias, visto que é por agir de maneira não-seletiva que os agentes quimioterápicos utilizados na clínica promovem inúmeros efeitos tóxicos, os quais dificultam a continuidade da terapia e, conseqüentemente, a eficácia do tratamento (Giuliani *et al.*, 2010). Outras cisteíno proteases também demonstraram efeito citotóxico contra linhagens tumorais. A protease fastuosaina, originada da

Bromelia fastuosa, apresenta atividade citotóxica sobre células de melanoma B16F10 na concentração de 10 µg/mL mediada por uma ação direta da protease ou pela produção de anticorpos que promovem citotoxicidade e lise celular (Guimarães-Ferreira *et al.*, 2007). Sobre linhagens de carcinoma gastrointestinal humano (HT29-5F12, HT29-5M21, MKN45 e KATO-III), essa protease apresenta valores de CC-50 que variam de 29 a 142 µg/mL (Amini *et al.*, 2013). O efeito citotóxico também foi descrito para a bromelina, uma enzima proteolítica do *Ananas comosus*, a qual apresenta valor de CC-50 de 5×10^{-7} M sobre células de adenocarcinoma mamário. No entanto, para a mesma protease, esse efeito não foi observado sobre linhagens de melanoma murino B16F10 e de tumor de mama (Ehrlich) cujos valores de CC-50 foram maiores que 10^{-6} M (Báez *et al.*, 2007).

Durante a progressão tumoral, a célula cancerosa, para colonizar outros órgãos, se dissocia do tumor primário e, através dos sistemas sanguíneo e/ou linfático, se dissemina e extravasa para invadir o parênquima de um novo órgão, fenômeno este chamado de metástase. Todo esse processo depende de eventos envolvendo a adesão, migração e invasão celular (Sarray *et al.*, 2009). A adesão e a migração celular se dão pelas interações existentes entre as moléculas de adesão presentes na superfície celular (caderinas, integrinas, selectinas e imunoglobulinas) e os diferentes componentes da matriz extracelular (MEC) como colágenos, fibronectina, laminina e vitronectina, bem como pelas interações célula-célula (Mcgary *et al.*, 2002).

Conforme descrito por Dittz (2011), quando expostas à primeira fração proteolítica (P1G10) do látex de *V. cundinamarcensis*, as células B16F10 perdem sua adesão e têm sua morfologia alterada. Assim, no intuito de avaliar se as proteases seriam capazes de promover alguma alteração quanto à adesão dessas células, foi conduzido um experimento no qual estas células, semeadas em placas de poliestireno, foram tratadas com diferentes concentrações e períodos. Nessas condições, foram observados diferentes níveis de redução da adesão celular para as proteases. Dentre elas, se destaca a protease CMS2MS3 que mostrou esse efeito a partir de 2h de exposição nas concentrações entre 10 e 50 µg/mL com uma redução máxima de 75% na maior concentração e no maior tempo analisado.

Dentre todas as proteases avaliadas, CMS2MS3 foi a mais potente em inibir a viabilidade celular, sendo mais seletiva para a linhagem B16F10 que para Melan-A, e em de reduzir a adesão em placas de poliestireno. Para a continuidade do estudo,

a concentração de 10 µg/mL foi definida considerando seu efeito na redução da adesão sem alteração da viabilidade celular por até 24h de exposição (Figuras 10 e 11).

A adesão celular aos componentes da MEC se dá, principalmente, por meio das integrinas (Tucker, 2006), embora outras moléculas como as glicoproteínas de superfície celular (e. g. CD44) também possam realizá-la (Koukoulis *et al.*, 1998). As integrinas são moléculas heterodiméricas, de localização transmembranar, compostas pelas subunidades α e β , as quais existem em dezoito subunidades α e oito subunidades β que se combinam para formar pelo menos vinte e quatro diferentes receptores. As integrinas podem se ligar a um ou mais componentes da MEC e este padrão espaço-temporal pode determinar como a célula responderá ao microambiente no qual se encontra (Seguin *et al.*, 2015). Quando avaliado o efeito de CMS2MS3 na adesão de células B16F10 sobre diferentes componentes da MEC, observamos uma redução na adesão dessas células a todos os componentes da matriz sendo maior para a vitronectina e laminina (Figura 12).

A interação da porção extracelular das integrinas com os componentes da MEC constitui um sítio de ancoragem localizado no seu lado citoplasmático para o citoesqueleto de actina e vários outros mediadores de vias de sinalização intracelular, formando pontos de adesões focais (Lo, 2006). Na porção citoplasmática das adesões focais, estão ancoradas proteínas estruturais como actina, talina, e tensina; proteínas com atividade enzimática como a quinase de adesão focal (FAK) e proteína quinase C (PKC); e proteínas adaptadoras como paxilina e caveolina-1 (Harjanto e Zaman, 2010). Em tecidos, as adesões focais não são tão numerosas quanto outras estruturas como as junções *tag* e *gap*, desmossomos e hemidesmossomos. Embora haja especulação de que as adesões focais sejam estruturas artificiais encontradas em células cultivadas em superfícies rígidas, Fuchs *et al.* (1997) mostraram, por microscopia imunoelétrica, a presença destas estruturas *in vivo*. As adesões focais, além de fornecerem uma conexão física entre a célula e os componentes da MEC, controlam a sinalização de vias ligadas à proliferação, migração, invasão e sobrevivência celular (Lock *et al.*, 2008).

Uma vez que observamos que a protease CMS2MS3 promove perda da adesão de células B16F10, decidimos analisar o seu efeito sobre as adesões focais. Para isso, as células foram expostas à protease entre 2 e 24h e, por meio de microscopia confocal, tiveram quantificada a área total de vinculina que se

encontrava localizada na membrana celular. CMS2MS3 diminuiu a área de vinculina em todos os tempos analisados, com uma redução maior que 85% a partir de 4h de tratamento (Figura 14) sendo, ainda, observada mudanças na morfologia da célula, caracterizadas por um arredondamento e diminuição do volume celular (Figura 13). Dessa maneira, podemos sugerir que a diminuição da adesão promovida pela protease envolve as integrinas e que se deve, possivelmente, a uma ação direta, uma vez que esse efeito foi observado após 2h de tratamento. O percentual de redução da área de vinculina se assemelha, na maioria das vezes, ao percentual de redução da adesão de B16F10 à vitronectina e laminina quando analisados os mesmos tempos de exposição à protease.

Embora existam poucos trabalhos que mostrem a ação de cisteíno proteases sobre a adesão de células tumorais, Tysnes *et al.* (2001) mostraram que a bromelina promove redução da adesão de células de glioma em concentrações que variam de 25 a 100 µg/mL a partir de 60 min de exposição. O efeito de proteases sobre a adesão celular foi descrito, inicialmente, por Zetter Br Fau - Chen *et al.* (1976) os quais mostraram uma redução na adesão de fibroblastos de embriões de galinha expostos à bromelina. Outros trabalhos descrevem o efeito dessa protease em alterar a adesão de macrófagos e neutrófilos em etapas que participam do processo de migração das células do sistema imune (Hale *et al.*, 2002; Fitzhugh *et al.*, 2008). Ainda, Kaiser *et al.* (2013) mostraram que a papaína foi mais eficiente que a tripsina em promover a dissociação de cultura de neurônios após 30 min de exposição às proteases. Čavić *et al.* (2012) mostraram que a actinidina, uma cisteíno protease do kiwi, promove redução da adesão de células de epitélio intestinal (T84) em superfície de poliestireno e ao colágeno após 1h de exposição a concentração de 1 mg/mL. Esse efeito é dependente da atividade proteolítica da actinidina, uma vez que ele não foi observado após inativação desta atividade por choque térmico ou por inibidores de protease.

O nível de expressão das integrinas em cada tipo de célula tumoral tem relação direta com as características fenotípicas do tumor, estando associado à capacidade de invasão e de promover metástases (Desgrosellier e Cheresch, 2010). Por exemplo, melanócitos normais e estágios iniciais de *nevo* displásico possuem baixa expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$ enquanto que melanomas metastáticos apresentam altos níveis (Aiyer e Varner, 2005). Essa mesma integrina está associada à metástase em linfonodos e nos ossos em cânceres de pâncreas e de

próstata, respectivamente (Hosotani *et al.*, 2002; McCabe *et al.*, 2007). Por sua vez, a superexpressão de integrina $\alpha_6\beta_4$ está relacionada ao desenvolvimento de uma maior massa tumoral e diminuição da sobrevida em portadores de câncer de mama (Friedrichs *et al.*, 1995; Diaz *et al.*, 2005). Quanto às células da linhagem tumoral B16F10, estas expressam altos níveis das subunidades α_1 , α_4 , α_v e β_1 de integrinas e baixos níveis de α_5 e α_6 , enquanto que não expressam as cadeias α_2 , α_3 e β_2 (Nobumoto *et al.*, 2008).

Em virtude dos resultados de CMS2MS3 sobre a adesão celular, decidimos investigar seu efeito sobre as subunidades de integrina mais expressas na linhagem B16F10. A Figura 15 mostra que o tratamento com a protease promoveu uma redução estatisticamente significativa nos níveis das subunidades α_4 , α_5 , e β_1 , enquanto que não houve diminuição da subunidade α_v . A redução da expressão fenotípica dessas subunidades ocorreu proporcionalmente ao tempo de exposição à CMS2MS3, sendo máxima após 24h. As subunidades analisadas estão relacionadas à formação de integrinas que medeiam a adesão a muitos componentes da MEC. A subunidade α_4 , quando complexada com a β_1 tem como ligantes a fibronectina e a proteína vascular de adesão celular (VCAM), enquanto que a subunidade α_5 participa da interação de integrinas com a fibronectina, fibrinogênio e CD171 ($\alpha_5\beta_1$). Por sua vez, a subunidade α_v é capaz de se ligar a uma grande variedade de subunidades β , tendo como ligante a fibronectina ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$ e $\alpha_v\beta_8$), vitronectina ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$) e colágeno ($\alpha_v\beta_3$). A subunidade β_1 , como já descrita, participa da interação com a maior parte dos componentes da MEC, inclusive a laminina ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_7\beta_1$) (Plow *et al.*, 2000; Aiyer e Varner, 2005).

A diminuição da expressão fenotípica das subunidades de integrina que foram analisadas corroboram os resultados descritos anteriormente sobre a diminuição da adesão das células tratadas aos componentes da MEC e dos pontos de adesão focal. Considerando que a laminina e a vitronectina foram os principais componentes da MEC aos quais a diminuição da adesão foi mais expressiva, sugerimos que esse efeito, para a vitronectina, foi devido a ação da protease sobre a subunidade β_1 enquanto que, para a laminina, além da subunidade β_1 , outras não analisadas (α_1 , α_2 , α_3 e α_7) podem contribuir para este efeito.

A perda da adesão ou incapacidade de se aderir aos componentes da matriz extracelular é um fator importante que pode contribuir para a diminuição da disseminação metastática do tumor. Após invadir o sistema vascular, o

espalhamento do tumor pela via hematogênica depende de interações com os componentes deste tecido como as células sanguíneas, plaquetas e proteínas solúveis. Células tumorais possuem a capacidade de induzir agregação plaquetária (agregação plaquetária induzida por célula tumoral, APICT) por meio da estimulação da liberação de grânulos plaquetários que promovem, então, a ativação de componentes pró-agregantes como tromboxano A₂, ADP e MMP-2. A APICT confere vantagens à célula tumoral no que se refere à sua sobrevivência, por evadir à ação do sistema imunológico, e a formação de metástase em decorrência da obstrução de pequenos vasos por trombos contendo células tumorais (Medina *et al.*, 2012). A interação da célula tumoral com as plaquetas se dá, dentre outras formas, por meio de integrinas localizadas na superfície da plaqueta (por exemplo $\alpha\text{IIb}\beta\text{3a}$), proteínas solúveis no plasma (fibronectina, vitronectina, VWF, etc) e integrinas presentes na célula tumoral (como a VLA-4) (Scaloni *et al.*, 1996). Embora essa etapa da disseminação metastática não tenha sido avaliada, os achados referentes à perda da adesão de B16F10 aos componentes da MEC após tratamento com CMS2MS3 e aqueles sobre ao efeito fibrinolítico da fração P1G10, descrito por Bilheiro *et al.* (2013) sugerem uma participação nesse processo.

É importante ressaltar, ainda, que os resultados do efeito de CMS2MS3 sobre as subunidades de integrinas analisadas não exclui a possibilidade de que outras classes de moléculas de adesão possam ser, também, alvos para a protease.

O efeito da fração menos purificada de *V. cundinamarcensis*, P1G10, sobre a adesão de células tumorais aos componentes da MEC já foi avaliado pelo nosso grupo de pesquisa. P1G10 foi capaz de reduzir a adesão de células de melanoma murino não metastático (B16F1) e metastático (B16F10) e carcinoma murino de cólon (CT26.WT) aos componentes da MEC, após tratamento por 1h com concentrações que variaram de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Dittz, 2011; Dittz *et al.*, 2015). Ainda, foi mostrado que P1G10 diminui a capacidade de invasão de células B16F10 e CT26.WT em membranas revestidas com colágeno. Esse efeito que pode estar ligado à redução da capacidade de adesão das células tratadas que, por sua vez, impede a degradação da matriz de colágeno e, conseqüentemente, a migração através da membrana (Dittz, 2011).

A sinalização intracelular em favor dos eventos de proliferação, migração e sobrevivência celular fica comprometida a partir do momento em que há perda da adesão à matriz extracelular. Assim, os sinais intracelulares se voltam para a

inibição da via proliferativa e indução de apoptose (Frisch e Ruoslahti, 1997; Frisch e Screaton, 2001; Paoli *et al.*, 2013).

Dando início ao estudo sobre a morte de células B16F10 expostas à CMS2MS3, foi avaliada a fragmentação do DNA destas células em gel de agarose (Figura 17). Não foi observado qualquer efeito da protease nos tempos analisados (2 a 24h), uma vez que as bandas não apresentaram fragmentação do DNA compatível com o padrão característico (20 a 300 pb) da morte por apoptose (Saraste e Pulkki, 2000). Embora esse tipo de análise seja uma maneira primária de avaliar a morte celular por apoptose, nem todas as células apoptóticas evidenciam uma fragmentação extensiva do DNA (Archana *et al.*, 2013), podendo, neste caso, não ter sido detectada pela técnica ou, de fato, por uma inexistência deste evento nos tempos analisados.

A fragmentação do DNA foi avaliada, também, por citometria de fluxo, quando células B16F10 tratadas com CMS2MS3 foram marcadas com iodeto de propídeo (PI). Esse fluorocromo se liga estequiometricamente na proporção de 1 molécula de PI para cada 4 pares de bases dos ácidos nucleicos (Riccardi e Nicoletti, 2006). Como mostra a Figura 18, na concentração de 10 µg/mL, CMS2MS3 não promoveu aumento no percentual de DNA subdiploide, quando comparado ao controle, em todos os tempos analisados (2, 4, 8 ou 24h). O efeito sobre a fragmentação só foi observado na concentração de 50 µg/mL após 8 ou 24h de tratamento.

Embora a fragmentação do DNA, uma medida indireta da morte celular por apoptose, seja observada apenas para 50 µg/mL de CMS2MS3, é possível que já exista, para concentrações menores da protease, ativação desta via. Sendo assim, paralelamente aos ensaios de fragmentação do DNA, avaliamos o efeito de CMS2MS3 sobre os níveis intracelulares de proteínas marcadoras da apoptose. Após o tratamento de B16F10 com 10 µg/mL da protease por 2 a 24h, foram determinados os níveis de caspase 9 e caspase 3 (Figura 19). Como normalizador, foi utilizado o GAPDH (enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) que é uma proteína da via glicolítica, constitutivamente expressa nos tecidos e frequentemente utilizada como controle de alterações na expressão de outras proteínas (Barber *et al.*, 2005). A escolha do GAPDH como controle se baseou no fato de que a beta actina, uma outra proteína amplamente utilizada como controle, tem alteração na sua expressão em função de mudanças nas interações entre a célula e componentes da MEC (Farmer *et al.*, 1983).

Foi observado que, a partir de 2h de tratamento, houve ativação das caspases 9 e 3 (Figuras 19A e 19B, respectivamente). O aumento nos níveis da forma ativa da caspase 9, iniciadora, e da caspase 3, executora, sugere uma possível ativação da via intrínseca da apoptose, uma vez que, a partir da liberação de citocromo c pela mitocôndria, este leva à conversão da pró-caspase 9 em caspase 9 (forma ativa) que, por sua vez, ativa a pró-caspase 3 em caspase 3 (Boatright e Salvesen, 2003). Para a caspase 9, o cálculo foi realizado em função da quantidade de pró-caspase 9 e do normalizador GAPDH pois, embora o anticorpo utilizado também fosse específico para os fragmentos ativos da caspase 9, estes não foram detectados.

Apesar de sugerirmos uma ativação da apoptose pela via intrínseca, não podemos excluir a possível participação da via extrínseca, uma vez que a caspase 3 é comum às duas. Para avaliar essa hipótese, se faz necessária a determinação dos níveis de proteínas exclusivas da via extrínseca, como a caspase 8 (Goldar *et al.*, 2015).

Por meio de marcação com PI e Anexina V-FITC e posterior análise em citômetro de fluxo, também foi possível avaliar o efeito de CMS2MS3 em promover apoptose nas células B16F10 (Figura 20). A protease foi capaz de aumentar em 5% o número de células apoptóticas após 24h de tratamento. A fim de verificar a possibilidade de um efeito maior, nesse experimento, também foi avaliada a apoptose após 48h de exposição onde observamos um aumento de 20% comparado ao controle. Como controle positivo, foi utilizada a estaurosporina que tem ação citotóxica por inibir a proteína quinase e induzir apoptose (Zhang *et al.*, 2004). Embora o aumento no número de células apoptóticas após o tratamento com CMS2MS3 não tenha atingido os valores encontrados para a estaurosporina, fica evidente um evento recente da apoptose caracterizado pela exposição dos resíduos de fosfatidil serina (Vermes *et al.*, 1995), aos quais a Anexina V se liga, está presente a partir de 24h de tratamento com a protease.

Durante o processo de apoptose, há variação na concentração do íon cálcio (Ca^{2+}) entre os diferentes compartimentos celulares. Embora não seja claro como um único segundo mensageiro coordena diversos efeitos em uma célula, existem fortes evidências de que padrões espaciais dos sinais de Ca^{2+} podem variar em diferentes regiões celulares. O catabolismo de fosfolipídios, proteínas e ácidos nucléicos envolve enzimas, muitas das quais necessitam de Ca^{2+} para sua atividade.

Um aumento de Ca^{2+} pode resultar em ativação sustentada dessas enzimas e em degradação de constituintes celulares os quais, em último caso, levarão à morte da célula (Orrenius *et al.*, 1992; Nicotera *et al.*, 1994). Os efeitos decorrentes do aumento nos níveis de Ca^{2+} intranuclear diferem dos efeitos promovidos pelo aumento deste íon no citosol (Leite *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2003). A entrada de Ca^{2+} no núcleo se dá a partir do citoplasma, por difusão desse íon através de poros no envelope nuclear (Hennager *et al.*, 1995; Lipp *et al.*, 1997) ou, ainda, do lúmen do próprio envelope nuclear que é contíguo ao lúmen do retículo endoplasmático (Bachs *et al.*, 1992; Rogue *et al.*, 1998). No núcleo, o Ca^{2+} regula processos específicos (Gomes *et al.*, 2006) como translocação de proteínas quinases (Echevarría *et al.*, 2003), proteínas de transporte da membrana nuclear (Perez-Terzic *et al.*, 1999), transcrição de certos genes (Pusl *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2003) e apoptose (Nicotera *et al.*, 1994). Mudanças maciças e repentinas nos níveis intracelulares de Ca^{2+} podem resultar em desorganização do citoesqueleto, disfunção mitocondrial e dano ao DNA, por alterações na expressão gênica, ativação de proteases, bem como mudanças na conformação da cromatina e na sua susceptibilidade à clivagem por endonucleases (Nicotera *et al.*, 1992; Nicotera *et al.*, 1994).

O efeito de CMS2MS3 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre o fluxo de Ca^{2+} em B16F10 foi caracterizado por um aumento deste íon no núcleo cerca de duas vezes maior do que no citoplasma. Esse aumento é máximo quando decorridos 10s da adição de CMS2MS3, retornando a níveis próximos dos basais nos 15s seguintes (Figura 21). A maior quantidade de Ca^{2+} nuclear é compatível com os eventos de fragmentação do DNA e indução de apoptose, relatados neste trabalho e na literatura.

A etapa que precede a ativação das caspases é a liberação do citocromo c do espaço intermembranar das mitocôndrias, sendo esta liberação caracterizada por um aumento na concentração de Ca^{2+} mitocondrial (Naon e Scorrano, 2014). Dessa forma, avaliamos a participação do Ca^{2+} mitocondrial no processo de morte celular de B16F10 promovido por CMS2MS3. Os resultados mostrados na Figura 22 evidenciam um aumento na concentração de Ca^{2+} mitocondrial 115s após a adição de CMS2MS3 nas células de melanoma. Um aumento na concentração de Ca^{2+} mitocondrial leva à abertura de poros de transição de permeabilidade (PTP), resultando em colapso do gradiente eletroquímico mitocondrial, aumento do volume da organela e liberação de proteínas localizadas no espaço intermembranar,

incluindo os ativadores de apoptose como o citocromo c (Naon e Scorrano, 2014). A liberação citocromo c também é mediada pela superexpressão da proteína pro-apoptótica BAX a qual está envolvida na liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e no aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, resultando na liberação do ativador de caspase (Scorrano *et al.*, 2003; Cosentino e García-Sáez, 2014). Os dados referentes ao aumento de Ca^{2+} mitocondrial e nuclear nas células B16F10 tratadas com CMS2MS3 nos permite sugerir que, em decorrência deste efeito, há uma liberação de citocromo c, ativação da caspase 9 (indutora) seguida pela ativação da caspase 3 (executora) e possível ativação de endonucleases que promoveriam a fragmentação do DNA destas células.

Os efeitos da fração P1G10, sobre a morte celular também foram avaliados por meio da fragmentação do DNA de células de melanoma não metastático B16F1 em trabalhos anteriores. P1G10 aumentou a quantidade de DNA subdiploide em duas vezes após 4h de exposição e em cinco vezes após 24h, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado às células controle (Dittz *et al.*, 2015). A grandeza do aumento da quantidade de DNA subdiploide quando as células foram tratadas com P1G10 foi da mesma ordem à observada neste estudo, para a mesma concentração de CMS2MS3 nos tempos de 8h e 24h (Figura 18). Resultados prévios também mostraram os efeitos de P1G10, CMS1 e CMS2 sobre a fragmentação do DNA de células B16F10. P1G10 e CMS2, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, promoveram um aumento estatisticamente significativo no conteúdo de DNA subdiploide, comparado ao controle. Esse efeito não foi observado para CMS1, corroborando os dados de que a ação sobre as células tumorais, observadas para P1G10 são resultados da ação das proteases contidas em CMS2 (Dittz, 2011).

Outras proteases também tiveram descritos os seus efeitos pró-apoptóticos em muitas linhagens tumorais. Uma mistura de tripsina e quimiotripsina (800 ng/mL) quando adicionada em células de carcinoma de mama (MCF-7 e MDA-MD-231), por 5h permitiu a visualização de células pré-apoptóticas marcadas com DAPI (Novak e Trnka, 2005). Ainda, um extrato aquoso de *Carica papaya* na concentração de 2% aumentou o percentual de marcação para a Anexina V em células Jukart (linfócito T) e um aumento de caspases 3 e 7, na mesma linhagem, após 24h de tratamento (Otsuki *et al.*, 2010). Dentre as cisteíno proteases de origem vegetal, a bromelina foi a mais extensamente estudada quanto a sua atividade pró-apoptótica. Em linhagem

humana de adenocarcinoma de cólon (Caco-2), a bromelina foi capaz de induzir apoptose por ativação das caspases 3 e 7 nas concentrações de 1 e 10 µg/mL após 24h de tratamento (Romano *et al.*, 2014). Em linhagem de carcinoma gástrico humano (MKN45), essa protease promoveu aumento na expressão de citocromo c e diminuição na expressão de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, após 72h de tratamento na concentração de 200 µg/mL (Amini *et al.*, 2013). Um aumento na expressão de caspases 3 e 9 também foi observado quando células de carcinoma humano de mama (GI-101A) foram tratadas com 20 µg/mL de bromelina por 24h (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). Comparando os efeitos da bromelina sobre a apoptose, na maioria das linhagens avaliadas a protease CMS2MS3 mostrou ser mais potente, uma vez que seus efeitos foram em menores concentrações e em alguns casos, em menor tempo de exposição.

A relação entre a perda da adesão celular aos componentes da MEC e o fenômeno de apoptose já é descrita e recebe o nome de *Anoikis* (Frisch e Screaton, 2001; Valentijn *et al.*, 2004). Por definição, *Anoikis* é, essencialmente, apoptose, com todas as alterações que a caracterizam como ativação de caspases e fragmentação nuclear (Valentijn *et al.*, 2004). A existência da *Anoikis* implica que a sinalização pelas integrinas regula componentes imprescindíveis para apoptose (Frisch e Ruoslahti, 1997) fornecendo um *link* estrutural entre a MEC e o citoesqueleto por meio das adesões focais.

A interação MEC-integrina-complexo de adesão focal promove fosforilação da a FAK, ativando proteínas das vias mitogênicas, tais como a PI3K que, por sua vez, ativa a proteína quinase B (PKB/AKT), além das vias da ERK e MAPK. Todas essas vias de sinalização favorecem a proliferação, crescimento e sobrevivência celular (Frisch e Screaton, 2001).

A perda da ligação ou uma ligação inespecífica entre uma integrina e os componentes da MEC promove alterações estruturais e moleculares na célula. Dentre as alterações estruturais, se destacam o arredondamento seguido da perda da adesão, favorecendo uma aproximação dos receptores Fas e sua ativação (Grossmann, 2002). Estando em suspensão, todo o citoesqueleto é perturbado causando liberação de BMF, com ação pró-apoptótica por inibir o efeito de Bcl-2, bem como um aumento na expressão de proteínas pró-apoptóticas como a BAX. Dessa forma, ocorre a liberação de citocromo c e, conseqüente ativação das caspases (Frisch e Ruoslahti, 1997; Grossmann, 2002).

Os resultados obtidos para CMS2MS3 sugerem que a protease, na concentração de 10 µg/mL esteja induzindo apoptose em células B16F10 em decorrência da diminuição da adesão, ou seja, *Anoikis*. Essa inferência é feita considerando que o evento de perda de adesão precede o de morte celular. A perda de adesão foi observada a partir de 2h de tratamento com CMS2MS3 em todos os experimentos realizados (Figuras 10, 12 e 14). Embora não tenha sido observada a fragmentação do DNA das células em até 24h de tratamento com a protease (Figuras 17 e 18), já havia a ativação da via apoptótica caracterizada pelo aumento das caspases 9 e 3 (Figura 19), resultado também comprovado por citometria de fluxo onde, após 24h de tratamento, as células exibiam um aumento na marcação positiva para Anexina V, característica de um evento recente de apoptose (Figura 20). Para que se tenha uma melhor caracterização desse evento, é importante a avaliação da via proliferativa nas células tratadas, uma vez que, durante a *Anoikis*, há diminuição da expressão de proteínas como AKT, ERK e JNK bem como aquelas que fazem parte das adesões focais como FAK e paxilina.

A perda de sensibilidade da célula ao fenômeno de *Anoikis* tem sido correlacionada com o potencial tumorigênico e metastático de células cancerosas (Webb *et al.*, 2004; Jagadeeswaran *et al.*, 2008; Golubovskaya *et al.*, 2009). Os resultados obtidos sugerem que CMS2MS3 diminui as adesões focais e induz à *Anoikis*, o que conduziu a uma investigação se a protease inibe o potencial metastático de células B16F10.

Com o intuito de avaliar se o efeito sobre a adesão das células B16F10 expostas a CMS2MS3 poderia, de alguma maneira, influenciar na redução de metástases, utilizamos, para esta finalidade um modelo animal. Após o tratamento *in vitro* das células B16F10 com 10 µg/mL de CMS2MS3 por 2, 8 ou 24h a mesma quantidade de células viáveis, para cada grupo, foi injetada na veia caudal dos animais. Como mostrado na Figura 25, o número de metástases pulmonares reduziu em todos os tempos de tratamento sendo máxima após 24h. Embora esse modelo não represente todas as etapas que compõem o desenvolvimento tumoral como a intravasamento e extravasamento celular, ele é amplamente utilizado para avaliação da atividade antimetastática de vários compostos (Fidler, 1973; Kim *et al.*, 2013; Athawale *et al.*, 2014; Pickarski *et al.*, 2015). A redução das metástases após o tratamento *in vitro* das células pode estar relacionada à diminuição do número e/ou funcionalidade das integrinas na superfície celular, visto que CMS2MS3 parece ter

ação direta sobre algumas das suas subunidades. Ainda, as células inoculadas, mesmo que viáveis pelo método de exclusão pelo corante Azul de Tripano, poderiam estar comprometidas com o mecanismo de apoptose, reduzindo a eficiência da colonização pulmonar. A perda da adesão celular é um estímulo para a indução de apoptose (*Anoikis*), no entanto, células com grande capacidade de metastatização possuem resistência a este mecanismo de morte. Embora, em nossos resultados, não tenha sido observada diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 24h (sem tratamento), é descrito na literatura que células aderentes que sobrevivem a cultivo em condições que impeçam a sua adesão (e.g.: placas revestidas com o polímero poly-HEMA), apresentam maior capacidade de promoverem metástase, quando inoculadas, por serem mais resistentes à *Anoikis* (Cieply *et al.*, 2015). Possivelmente, a inexistência de diferença naqueles grupos se deu pelo tempo em que as células permaneceram em suspensão, uma vez que, tempos de cultivos superiores a 24h são muitas vezes utilizados em estudos para avaliação da *Anoikis* (Chunhacha *et al.*, 2013; Leblond *et al.*, 2013; Winitthana *et al.*, 2014; Uen *et al.*, 2015) ou, ainda, pelo número reduzido de animais em cada grupo experimental.

Lemos (2014) mostrou que a sub-fração CMS2 (10 µg/mL, por 24h) reverteu em B16F10, para níveis próximos aos da linhagem não tumorigênica de melanócito, Melan-A, as proteínas nucleofosmina 1, proteína de choque térmico 65, proteína ligante a calciclina e fator de iniciação da tradução eucariótica 4H, super-expressas em B16F10, e que participam da proliferação, sobrevivência, invasão e migração celular. Também foi observada a redução de ciclofilina A, proteína precursora de dissulfeto isomerase A3 e calreticulina, chaperonas super-expressas em células tumorais, e do inibidor da dissociação de guanosina difosfato 2, que em altos níveis promove a transição epitélio-mesenquimal e impede a ativação de caspases. A redução do número de colônias pulmonares, promovidas por CMS2MS3, ainda, levanta a hipótese da possibilidade de efeito desta protease sobre mecanismos celulares que diminuiriam a resistência à *Anoikis*, como aqueles que participam da regulação da transição epitélio-mesenquimal durante a carcinogênese, uma vez que houve indício desta regulação pela sub-fração CMS2, precursora da protease.

Muitos compostos antitumorais, ainda em estudos pré-clínicos e clínicos, apresentam seu mecanismo de ação mediado por processos que estão ligados às integrinas e outros componentes das adesões focais cujo bloqueio ou inibição leva, conseqüentemente, a indução da apoptose. Compostos que atuam promovendo a

inibição da FAK estão tanto em avaliações pré-clínicas (Weis *et al.*, 2008) quanto em estudos clínicos de fase I (Roberts *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2012) e II (Yoon *et al.*, 2015) em modelos e câncer humano de pâncreas e próstata. Por outro lado, as integrinas são alvos farmacológicos de drogas como o Voloxicimab, um anticorpo anti-integrina $\alpha_5\beta_1$, que se encontra em estudo clínico de fase II para pacientes com câncer peritoneal primário ou câncer ovariano resistente a cisplatina (Bell-Mcguinn *et al.*, 2011). Outro fármaco, atualmente em estudos clínicos de fase III para o tratamento de glioblastoma, é a Cilengitida que age por meio do bloqueio das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$, levando a indução da via apoptótica (Scaringi *et al.*, 2012).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a protease CMS2MS3 atua em eventos importantes da progressão tumoral. A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos que tenham como alvo as etapas envolvidas no processo de formação de metástase se mostram como alternativas promissoras no tratamento do câncer, visto que os principais fármacos quimioterápicos em uso na clínica tanto não possuem uma ação seletiva contra a célula tumoral quanto não são eficazes em impedir a disseminação do tumor.

7 CONCLUSÃO

Através deste estudo, podemos concluir que o efeito antimetastático das frações P1G10 e CMS2 do látex de *V. cundinamarcensis* sobre células de melanoma murino B16F10 são, pelo menos em parte, mediados pela protease CMS2MS3. Os mecanismos envolvidos nesse efeito incluem a morte celular por ativação da via apoptótica, precedida do aumento nos níveis de cálcio intranuclear e mitocondrial e da perda de adesão aos componentes da MEC, esta última, caracterizada por redução dos níveis das subunidades α_4 , α_5 e β_1 de integrinas.

8 PERSPECTIVAS

A fim de dar continuidade ao estudo sobre o mecanismo de ação da protease CMS2MS3, o próximo passo será o de verificar se o efeito ocorre por *Anoikis*, por meio de avaliação da via proliferativa e de proteínas que compõem o complexo de adesão focal e, também, avaliar o efeito desta protease sobre os eventos da transição epitélio-mesenquimal em linhagens tumorais.

Além disso, independentemente do mecanismo de ação, avaliar o efeito antimetastático da protease isolada e, considerando que a eficácia seja mantida ou aumentada em relação às frações menos purificadas, definir as suas características farmacocinéticas e toxicológicas, no intuito de termos o princípio ativo identificado e caracterizado como potencial fármaco quimioterápico.

9 REFERÊNCIAS

AIYER, A.; VARNER, J. A. Integrins in Cancer Progression and Therapy. **Science & Medicine**, v. 10, n. 2, p. 84-96, 2005.

ALIZADEH, A.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, S. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumor Biology**, v. 35, n. 9, p. 8483-8523, 2014.

ALMEIDA, V. L. D. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ALONSO, S. R. et al. Progression in Cutaneous Malignant Melanoma Is Associated with Distinct Expression Profiles: A Tissue Microarray-Based Study. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 1, p. 193-203, 2004.

AMINI, A. et al. Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5F12, and HT29-5M21). **OncoTargets and therapy**, v. 6, p. 403-409, 2013.

ANTHIS, N. J.; CAMPBELL, I. D. The tail of integrin activation. **Trends in biochemical sciences**, v. 36, n. 4, p. 191-198, 2011.

ARAÚJO, J. R.; ZAGO, M. M. F.; SILVA, S. R. D. Percepções sobre a vida e a doença por mulheres submetidas à quimioterapia antineoplásica. **Revista Mineira de Enfermagem**, v. 10, n. 3, p. 247-252, 2006.

ARCHANA, M. et al. **Various methods available for detection of apoptotic cells-A review**. 274-283, 2013.

ASSUNÇÃO GUIMARÃES, C.; LINDEN, R. Programmed cell deaths. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 9, p. 1638-1650, 2004.

ATHAWALE, R. B. et al. Etoposide loaded solid lipid nanoparticles for curtailing B16F10 melanoma colonization in lung. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, n. 2, p. 231-240, 2014.

AZARKAN, M. et al. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. **Phytochemistry**, v. 65, n. 5, p. 525-534, 2004.

BACHS, O.; AGELL, N.; CARAFOLI, E. Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1113, n. 2, p. 259-270, 1992.

BÁEZ, R. et al. In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. **Planta Medica**, v. 73, n. 13, p. 1377-1383, 2007.

BAEZA, G.; CORREA, D.; SALAS, C. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 51, n. 1, p. 1-9, 1990.

BANUELOS, O. et al. The specific transport system for lysine is fully inhibited by ammonium in *Penicillium chrysogenum*: an ammonium-insensitive system allows uptake in carbon-starved cells. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 0003-6072 (Print), 2000.

BARBER, R. D. et al. **GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues**. 2005.

BASTIDE, C. et al. Le traitement hormonal du cancer de la prostate. **Progrès en Urologie**, v. 23, n. 15, p. 1246-1257, 2013.

BATKIN S FAU - TAUSSIG, S.; TAUSSIG S FAU - SZEKERCZES, J.; SZEKERCZES, J. Modulation of pulmonary metastasis (Lewis lung carcinoma) by bromelain, an extract of the pineapple stem (*Ananas comosus*). **Cancer Investigation**, v. 6, n. 2, p. 241-242, 1988.

BEERS, E.; WOFFENDEN, B.; ZHAO, C. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. **Plant Molecular Biology**, v. 44, n. 3, p. 399-415, 2000.

BELL-MCGUINN, K. M. et al. A phase II, single-arm study of the anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. **Gynecologic oncology**, v. 121, n. 2, p. 273-279, 2011.

BEUTH, J. Proteolytic Enzyme Therapy in Evidence-Based Complementary Oncology: Fact or Fiction? **Integrative Cancer Therapies**, v. 7, n. 4, p. 311-316, 2008.

BILHEIRO, R. P. et al. The thrombolytic action of a proteolytic fraction (P1G10) from *Carica candamarcensis*. **Thrombosis Research**, v. 131, n. 4, p. e175-e182, 2013.

BOATRRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 725-731, 2003.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 12, p. 786-801, 2014.

BOURGIER, C. et al. Late side-effects after curative intent radiotherapy: Identification of hypersensitive patients for personalized strategy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 93, n. 3, p. 312-319, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAGA, A. D. **Efeito da fração proteolítica do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, P1G10, sobre o processo inflamatório tumoral.** 2013. 133. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

BRAVO, L. M.; HERMOSILLA, J.; SALAS, C. E. A biochemical comparison between latex from *Carica candamarcensis* and *C. papaya*. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 27, n. 12, p. 2831-2842, 1994.

CASSIDNY, J. et al. **Oxford Handbook of Oncology.** United Kingdon: Oxford University Press, 2010.

ČAVIĆ, M. et al. Actinidin, a protease from kiwifruit, induces changes in morphology and adhesion of T84 intestinal epithelial cells. **Phytochemistry**, v. 77, n. 0, p. 46-52, 2012.

CHOTHIA, C.; JONES, E. Y. The molecular structure of cell adhesion molecules. **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 823-862, 1997/06/01 1997.

CHUNHACHA, P.; SRIURANPONG, V.; CHANVORACHOTE, P. Epithelial-mesenchymal transition mediates anoikis resistance and enhances invasion in pleural effusion-derived human lung cancer cells. **Oncology Letters**, v. 5, n. 3, p. 1043-1047, 2013.

CIEPLY, B.; KOONTZ, C.; FRISCH, S. M. CD44S-hyaluronan interactions protect cells resulting from EMT against anoikis. **Matrix Biology**, n. 0, 2015.

COATES, J. M.; GALANTE, J. M.; BOLD, R. J. Cancer Therapy Beyond Apoptosis: Autophagy and Anoikis as Mechanisms of Cell Death. **Journal of Surgical Research**, v. 164, n. 2, p. 301-308, 2010.

COSENTINO, K.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Mitochondrial alterations in apoptosis. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 181, n. 0, p. 62-75, 2014.

DEGTEREV, A. et al. Chapter One - Assays for Necroptosis and Activity of RIP Kinases. In: AVI ASHKENAZI, J. A. W. e JUNYING, Y. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 545, p.1-33, 2014.

DENADAI, A. M. et al. A supramolecular complex between proteinases and beta-cyclodextrin that preserves enzymatic activity: physicochemical characterization. **BioDrugs**, v. 20, n. 5, p. 283-291, 2006.

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

DESSER, L. et al. Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF-beta levels in human blood. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 47, p. 10-15, 2001.

DHANDAYUTHAPANI, S. et al. Bromelain-induced apoptosis in GI-101A breast cancer cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 4, p. 344-349, 20120322 DCOM-20120716 2011.

DIAZ, L. K. et al. [beta]4 integrin subunit gene expression correlates with tumor size and nuclear grade in early breast cancer. **Mod Pathol**, v. 18, n. 9, p. 1165-1175, 05/27/online 2005.

DITZ, D. **Efeito antimetastático e mecanismos de ação de proteases do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis* (*Carica candamarcensis*)**. 2011. 109. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

DITZ, D. et al. Antiangiogenesis, Loss of Cell Adhesion and Apoptosis Are Involved in the Antitumoral Activity of Proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) in Murine Melanoma B16F1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 7027-7044, 2015.

DUBOIS, T. et al. The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. I. Fractionation, purification and preliminary characterization. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 369, n. 8, p. 733-740, 1988.

ECHEVARRÍA, W. et al. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. **Nature cell biology**, v. 5, n. 5, p. 440-446, 2003.

ECKHART, L. et al. Cell death by cornification. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3471-3480, 2013..

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FAN, Y. et al. Focal Adhesion Dynamics Are Altered in Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 74, n. 6, p. 418-426, 2013.

FARMA, J. M.; KULKARNI, N.; HSU, C. Surgical Management of Primary and Recurrent Melanoma. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 239-247, 2015.

FARMER, S. R. et al. Regulation of actin mRNA levels and translation responds to changes in cell configuration. **Molecular and Cellular Biology**, v. 3, n. 2, p. 182-189, 1983.

FEITELSON, M. A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, n. 0, 2015.

FIDLER, I. J. The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. **European Journal of Cancer**, v. 9, n. 3, p. 223-227, 1973.

FIGUEIREDO, C. **Avaliação das propriedades antitumoral e antimetastática de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* em modelo de melanoma murino**. 2009. 87 Dissertação (Mestre). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

FITZHUGH, D. J. et al. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. **Clinical Immunology**, v. 128, n. 1, p. 66-74, 2008.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, 2008.

FRIEDRICHS, K. et al. High Expression Level of $\alpha 6$ Integrin in Human Breast Carcinoma Is Correlated with Reduced Survival. **Cancer Research**, v. 55, n. 4, p. 901-906, 1995.

FRISCH, S. M.; RUOSLAHTI, E. Integrins and anoikis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 701-706, 1997.

FRISCH, S. M.; SCRETON, R. A. Anoikis mechanisms. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 555-562, 2001.

FUCHS, E. et al. Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 7, n. 5, p. 672-682, 1997.

GADELIYA GOODSON, A.; GROSSMAN, D. Strategies for early melanoma detection: Approaches to the patient with nevi. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 5, p. 719-735, 2009.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107-120, 2012.

GERARD, G. Anti-cancer therapy with bromelain. **Agressologie**, v. 13, p. 261-274, 1972.

GIULIANI, F. et al. Maintenance therapy in colon cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 36, Supplement 3, n. 0, p. S42-S45, 2010.

GOLDAR, S. et al. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 6, p. 2129-2144, 2015.

GOLUBOVSKAYA, V. M. et al. The direct effect of Focal Adhesion Kinase (FAK), dominant-negative FAK, FAK-CD and FAK siRNA on gene expression and human MCF-7 breast cancer cell tumorigenesis. **BMC Cancer**, v. 9, p. 280-280, 2009.

GOMES, D. A. et al. Calcium signaling in the nucleus This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled The Nucleus: A Cell Within A Cell. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 84, n. 3-4, p. 325-332, 2006/03/01 2006.

GOMES, M. T. et al. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. **Plant medica**, v. 71, n. 3, p. 244-248, 2005.

GOMES, M. T. R. **Caracterização bioquímica e farmacológica de proteases do látex de *Carica candamarcensis* com atividade mitogênica**. 2008. 146 Tese (Doutor). Departamento de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

GRAVINA DE MORAES, M.; TERMIGNONI, C.; SALAS, C. Biochemical characterization of a new cysteine endopeptidase from *Carica candamarcensis* L. **Plant Science**, v. 102, n. 1, p. 11-18, 1994.

GROSSMANN, J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis - Anoikis". **Apoptosis**, v. 7, p. 247-260, 2002.

GUADAMILLAS, M. C.; CEREZO, A.; DEL POZO, M. A. Overcoming anoikis – pathways to anchorage-independent growth in cancer. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 19, p. 3189-3197, 2011.

GUIMARÃES-FERREIRA, C. A. et al. Antitumor effects in vitro and in vivo and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. **Neoplasia**, v. 9, n. 9, p. 723-733, 2007.

HALE, L. P.; GREER, P. K.; SEMPOWSKI, G. D. Bromelain Treatment Alters Leukocyte Expression of Cell Surface Molecules Involved in Cellular Adhesion and Activation. **Clinical Immunology**, v. 104, n. 2, p. 183-190, 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANKINS, H. M. et al. Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution. **Traffic**, v. 16, n. 1, p. 35-47, 2015.

HARJANTO, D.; ZAMAN, M. H. Matrix mechanics and receptor-ligand interactions in cell adhesion. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 299-304, 2010.

HENNAGER, D. J.; WELSH, M. J.; DELISLE, S. Changes in either Cytosolic or Nucleoplasmic Inositol 1,4,5-Trisphosphate Levels Can Control Nuclear Ca²⁺ Concentration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 10, p. 4959-4962, 1995.

HIGGINS, G. S. et al. Drug radiotherapy combinations: Review of previous failures and reasons for future optimism. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 2, p. 105-113, 2015.

HILDEBRANDT, M. et al. Immunotherapy: opportunities, risks and future perspectives. **Cytotherapy**, v. 16, n. 4, Supplement, p. S120-S129, 2014.

HOSOTANI, R. et al. Expression of Integrin $\alpha V\beta 3$ in Pancreatic Carcinoma: Relation to MMP-2 Activation and Lymph Node Metastasis. **Pancreas**, v. 25, n. 2, p. e30-e35, 2002.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil**. CÂNCER, I. N. D. Rio de Janeiro: 124 p. 2014.

INFANTE, J. R. et al. Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Phase I Dose-Escalation Trial of PF-00562271, an Inhibitor of Focal Adhesion Kinase, in Advanced Solid Tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 13, p. 1527-1533, 2012.

JAGADEESWARAN, R. et al. Paxillin Is a Target for Somatic Mutations in Lung Cancer: Implications for Cell Growth and Invasion. **Cancer research**, v. 68, n. 1, p. 132-142, 2008.

KAISER, O. et al. Dissociated Neurons and Glial Cells Derived from Rat Inferior Colliculi after Digestion with Papain. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 8, n. 12, p. e80490, 2013.

KASIBHATLA, S. et al. Discovery and mechanism of action of a novel series of apoptosis inducers with potential vascular targeting activity. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 11, p. 1365-1374, 2004.

KELLY, G. S. Bromelain: a literature review and discussion of its therapeutic applications. **Alternative medicine review**, v. 1, n. 4, p. 405-410, 1996.

KIM, A. et al. Aqueous Extract of Bambusae Caulis in Taeniam Inhibits PMA-Induced Tumor Cell Invasion and Pulmonary Metastasis: Suppression of NF- κ B Activation through ROS Signaling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e78061, 2013.

KIRKHAM, N. et al. Type VII collagen antibody LH 7.2 identifies basement membrane characteristics of thin malignant melanomas. **The Journal of pathology**, v. 157, n. 3, p. 243-247, 1989.

KITANO, S. et al. A multicenter study on laparoscopic surgery for colorectal cancer in Japan. **Surgical Endoscopy And Other Interventional Techniques**, v. 20, n. 9, p. 1348-1352, 2006.

KONNO, K. et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **The Plant Journal**, v. 37, n. 3, p. 370-378, 2004.

KOUKOULIS, G. K.; PATRIARCA, C.; GOULD, V. E. Adhesion molecules and tumor metastasis. **Human pathology**, v. 29, n. 9, p. 889-892, 1998.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2008.

KYNDT, T. et al. Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp. **FEBS Journal**, v. 274, n. 2, p. 451-462, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAMBIN, P.; FINE, J. M. Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in linear polyacrylamide gradient gels in the absence of denaturing agents. **Analytical Biochemistry**, v. 98, n. 1, p. 160-168, 1979.

LEBLOND, P. et al. Cilengitide targets pediatric glioma and neuroblastoma cells through cell detachment and anoikis induction. **Anti-Cancer Drugs**, v. 24, n. 8, p. 818-825, 2013.

LEIPNER, J.; ITEN, F.; SALLER, R. Therapy with Proteolytic Enzymes in Rheumatic Disorders. **BioDrugs**, v. 15, n. 12, p. 779-789, 2001.

LEIPNER, J.; SALLER, R. Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. **Drugs**, v. 59, n. 4, p. 769-780, 2000.

LEITE, M. F. et al. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2975-2980, 2003.

LEMOS, F. D. O. **Análise proteômica comparativa de linhagens celulares de melanoma e melanócito murinos frente ao tratamento com fração proteolítica derivada do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis***. 2014. 200. (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

LEMOS, F. O. **Parâmetros farmacocinéticos da fração cromatográfica proteolítica P1G10 do látex de *Carica candamarcensis***. 2009. 112. Dissertação (Mestre). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

LEÓN, J. **Botánica de los cultivos tropicales**. 3a. IICA, 2000.

LEVENTIS, P. A.; GRINSTEIN, S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. **Annual Review of Biophysics**, v. 39, n. 1, p. 407-427, 2010.

LIPP, P. et al. Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 23, p. 7166-7173, 1997.

LIU FW FAU - CRIPE, J.; CRIPE J FAU - TEWARI, K. S.; TEWARI, K. S. Anti-Angiogenesis Therapy in Gynecologic Malignancies. LID - 211308 [pii]. **Oncology**, v. 29, n. 5, 2015.

LO, S. H. Focal adhesions: What's new inside. **Developmental Biology**, v. 294, n. 2, p. 280-291, 2006.

LOCK, J. G.; WEHRLE-HALLER, B.; STRÖMBLAD, S. Cell-matrix adhesion complexes: Master control machinery of cell migration. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 1, p. 65-76, 2008.

LOTTI, T. Controlled clinical studies of bromelain in the treatment of urogenital inflammation. **Drugs**, v. 46, p. 144-146, 1993.

MADORSKY ROWDO, F. P. et al. Immunotherapy in Cancer: A Combat between Tumors and the Immune System; You Win Some, You Lose Some. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 127, 2015.

MAHAVORASIRIKUL, W. et al. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 1, p. 55, 2010.

MCCABE, N. P. et al. Prostate cancer specific integrin $[\alpha]v[\beta]3$ modulates bone metastatic growth and tissue remodeling. **Oncogene**, v. 26, n. 42, p. 6238-6243, 2007.

MCGARY, E. C.; LEV, D. C.; BAR-ELI, M. Cellular Adhesion Pathways and Metastatic Potential of Human Melanoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 1, n. 5, p. 459-465, 2002.

MEDINA, C. et al. Differential inhibition of tumour cell-induced platelet aggregation by the nicotinate aspirin prodrug (ST0702) and aspirin. **British Journal of Pharmacology**, Oxford, UK, v. 166, n. 3, p. 938-949, 2012.

MELIS, G. Clinical experience with metoxybutropate vs bromelain in the treatment of female pelvic inflammation. **Minerva Gynecology**, v. 42, p. 309-312, 1990.

MELLO, V. J. Plant Proteinases: their Potential as Therapeutic Drugs. **Recent progress in medicinal plants drug development from molecules**, v. 11, p. 211-224, 2006.

MELLO, V. J. et al. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 4, p. 237-244, 2008.

MOSES, H.; BARCELLOS-HOFF, M. H. TGF- β Biology in Mammary Development and Breast Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, p. a003277, 2011.

MOUTIM, V. et al. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Plant Science**, v. 142, n. 2, p. 115-121, 1999.

NAGLE, R. B. et al. Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 6, p. 1498-1507, 1995.

NAON, D.; SCORRANO, L. At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 10, p. 2184-2194, 2014.

NATH, S. et al. Transcriptional control of mitosis: deregulation and cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, 2015.

NICOTERA, P.; BELLOMO, G.; ORRENIUS, S. Calcium-Mediated Mechanisms in Chemically Induced Cell Death. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 449-470, 1992.

NICOTERA, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. **Cell Calcium**, v. 16, n. 4, p. 279-288, 1994.

NOBUMOTO, A. et al. Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. **Glycobiology**, v. 18, n. 9, p. 735-744, 2008.

NOVAK, J. F.; TRNKA, F. Proenzyme Therapy of Cancer. **Anticancer Research**, v. 25, n. 2A, p. 1157-1177, 2005.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

ORRENIUS, S.; MCCABE JR, M. J.; NICOTERA, P. Ca²⁺-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. **Toxicology Letters**, v. 64-65, n. 0, p. 357-364, 1992.

OTSUKI, N. et al. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 3, p. 760-767, 2010.

PADILHA, M. et al. **Neoadjuvant Radiotherapy and Hormonotherapy in Locally Advanced Breast Cancer: State of the Art**. 2013.

PALMA, J. M. et al. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 6-8, p. 521-530, 2002.

PAOLI, P.; GIANNONI, E.; CHIARUGI, P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3481-3498, 2013.

PAPUCCI, L. et al. Apoptosis shifts to necrosis via intermediate types of cell death by a mechanism depending on c-myc and bcl-2 expression. **Cell and Tissue Research**, v. 316, n. 2, p. 197-209, 2004.

PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 311-320, 2015.

PEREZ-TERZIC, C. et al. Structural Plasticity of the Cardiac Nuclear Pore Complex in Response to Regulators of Nuclear Import. **Circulation Research**, v. 84, n. 11, p. 1292-1301, 1999.

PICKARSKI, M. et al. Orally active alphavbeta3 integrin inhibitor MK0429 reduces melanoma metastasis. **Oncology Reports**, v. 33, n. 6, p. 2737-2745, 2015.

PILLAI, K. et al. Anticancer Property of Bromelain With Therapeutic Potential in Malignant Peritoneal Mesothelioma. **Cancer Investigation**, v. 31, n. 4, p. 241-250, 2013.

PLOW, E. F. et al. Ligand Binding to Integrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 21785-21788, 2000.

PROSKURYAKOV, S. Y.; GABAI, V. L. Mechanisms of tumor cell necrosis. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 1, p. 58-68, 2010.

PUSL, T. et al. Epidermal Growth Factor-mediated Activation of the ETS Domain Transcription Factor Elk-1 Requires Nuclear Calcium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 30, p. 27517-27527, 2002.

PYKE, C. et al. The gamma 2 chain of kalinin/laminin 5 is preferentially expressed in invading malignant cells in human cancers. **The American Journal of Pathology**, v. 145, n. 4, p. 782-791, 1994.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

RIESER, M. J. et al. Five Novel Mono-tetrahydrofuran Ring Acetogenins from the Seeds of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 100-108, 1996.

ROBERTS, W. G. et al. Antitumor Activity and Pharmacology of a Selective Focal Adhesion Kinase Inhibitor, PF-562,271. **Cancer Research**, v. 68, n. 6, p. 1935-1944, 2008.

ROBINSON, G. W. Isolation and characterization of papaya peptidase A from commercial chymopapain. **Biochemistry**, v. 14, n. 0006-2960 (Print), p. 3695-700, 1975.

ROGUE, P. J. et al. cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and activates nuclear Ca²⁺-ATPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9178-9183, 1998.

ROMANO, B. et al. The chemopreventive action of bromelain, from pineapple stem (*Ananas comosus* L.), on colon carcinogenesis is related to antiproliferative and proapoptotic effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 3, p. 457-465, 2014.

ROUGON, G.; HOBERT, O. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. **Annual Review of Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 207-238, 2003.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

SARRAY, S. et al. Lelectin increases N-cadherin-mediated adhesion through PI3K/AKT pathway. **Cancer letters**, v. 285, n. 2, p. 174-181, 2009.

SCALONI, A. et al. Amino acid sequence and molecular modelling of glycoprotein IIb-IIIa and fibronectin receptor iso-antagonists from *Trimeresurus elegans* venom. **Biochemical Journal**, v. 319, n. Pt 3, p. 775-782, 1996.

SCARINGI, C. et al. Integrin Inhibitor Cilengitide for the Treatment of Glioblastoma: A Brief Overview of Current Clinical Results. **Anticancer Research**, v. 32, n. 10, p. 4213-4223, 2012.

SCORRANO, L. et al. BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis. **Science**, v. 300, n. 5616, p. 135-139, 2003.

SEGUIN, L. et al. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 4, p. 234-240, 2015.

SHALINI, S. et al. Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death Differ**, v. 22, n. 4, p. 526-539, 2015.

SHAPIRO, L.; LOVE, J.; COLMAN, D. R. Adhesion Molecules in the Nervous System: Structural Insights into Function and Diversity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 451-474, 2007.

SHORTT, J.; JOHNSTONE, R. W. Oncogenes in Cell Survival and Cell Death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 12, p. a009829, 2012.

SILVA, L. G. et al. Changes in protein profile during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, n. 0100-879X (Print), 1997.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. et al. Myriadenolide, a labdane diterpene isolated from *Alomia myriadenia* (asteraceae) induces depolarization of mitochondrial membranes and apoptosis associated with activation of caspases-8, -9, and -3 in Jurkat and THP-1 cells. **Experimental Cell Research**, v. 290, n. 2, p. 420-426, 2003.

SPERANDIO, S. et al. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1//Alix. **Cell Death Differ**, v. 11, n. 10, p. 1066-1075, 2004.

SULZMAIER, F. J.; JEAN, C.; SCHLAEPFER, D. D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 9, p. 598-610, 2014.

SUN, H. et al. Role of anti-angiogenesis therapy in the management of hepatocellular carcinoma: The jury is still out. **World Journal of Hepatology**, v. 6, n. 12, p. 830-835, 2014.

TADDEI, M. L. et al. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. **The Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 380-393, 2012.

TARGONI, O. S.; TARY-LEHMANN, M.; LEHMANN, P. V. Prevention of Murine EAE by Oral Hydrolytic Enzyme Treatment. **Journal of Autoimmunity**, v. 12, n. 3, p. 191-198, 1999.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.

TEIXEIRA, R. D. et al. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 956-961, 2008.

THOMPSON, M. et al. Inhibition of the TEF/TEAD transcription factor activity by nuclear calcium and distinct kinase pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 2, p. 267-274, 2003.

TOWER, J. Programmed cell death in aging. **Ageing Research Reviews**, n. 0, 2015.

TSE, J. C.; KALLURI, R. Mechanisms of metastasis: Epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 101, n. 4, p. 816-829, 2007.

TUCKER, G. C. Integrins: molecular targets in cancer therapy. **Current oncology reports**, v. 8, n. 2, p. 96-103, 2006.

TYSNES, B. B. et al. Bromelain Reversibly Inhibits Invasive Properties of Glioma Cells. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 3, n. 6, p. 469-479, 2001.

UEN, W.-C. et al. Anchorage independency promoted tumor malignancy of melanoma cells under reattachment through elevated interleukin-8 and CXC chemokine receptor 1 expression. **Melanoma Research**, v. 25, n. 1, p. 35-46, 2015.

VALENTIJN, A. J.; ZOUQ, N.; GILMORE, A. P. Anoikis. **Biochemical Society Transactions**, v. 32, p. 421-425, 2004.

VAN DIJK, M.; GÖRANSSON, S. A.; STRÖMBLAD, S. Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 11, p. 1663-1670, 2013.

VANTYGHM, S. A.; POSTENKA, C. O.; CHAMBERS, A. F. Estrous Cycle Influences Organ-specific Metastasis of B16F10 Melanoma Cells. **Cancer Research**, v. 63, n. 16, p. 4763-4765, 2003.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VIANA, C. T. R. **Avaliação da atividade antitumoral e imunomodulatória de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* Hook 1835 em modelo de carcinoma de Ehrlich**. 2010. 69. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

VILLALBA, M. I. C. **Avaliação de parâmetros toxicológicos da fração P1G10 obtida do látex de *Carica candamarcensis***. 2010. 97 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

VINEIS, P.; WILD, C. P. Global cancer patterns: causes and prevention. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 549-557, 2014.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.

WALRAEVENS, V. et al. Isolation and Primary Structure of the CCI Papain-Like Cysteine Proteinases from the Latex of *Carica candamarcensis* Hook. **Biological Chemistry**. 380: 485 p. 1999.

WEBB, D. J. et al. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 2, p. 154-161, 2004.

WEINBERG, R. A.; LUNDBERG, A. S. Control of the cell cycle and apoptosis. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 4, p. 531-539, 1999.

WEIS, S. M. et al. Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. **The Journal of Cell Biology**, v. 181, n. 1, p. 43-50, 2008.

WETZELS, R. H. et al. Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer. **The American journal of pathology**, v. 138, n. 3, p. 751-763, 1991.

WINITTHANA, T.; LAWANPRASERT, S.; CHANVORACHOTE, P. Triclosan Potentiates Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Anoikis-Resistant Human Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, n. 10, p. e110851, 2014.

XIONG, J.; BALCIOGLU, H. E.; DANEN, E. H. J. Integrin signaling in control of tumor growth and progression. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 5, p. 1012-1015, 2013.

YAKOVLEV, A. G.; FADEN, A. I. Mechanisms of Neural Cell Death: Implications for Development of Neuroprotective Treatment Strategies. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 5-16, 2004.

YOON, H. et al. Understanding the Roles of FAK in Cancer: Inhibitors, Genetic Models, and New Insights. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 63, n. 2, p. 114-128, 2015.

YOSHIOKA, K.-I. et al. Development of cancer-initiating cells and immortalized cells with genomic instability. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 483-489, 2015.

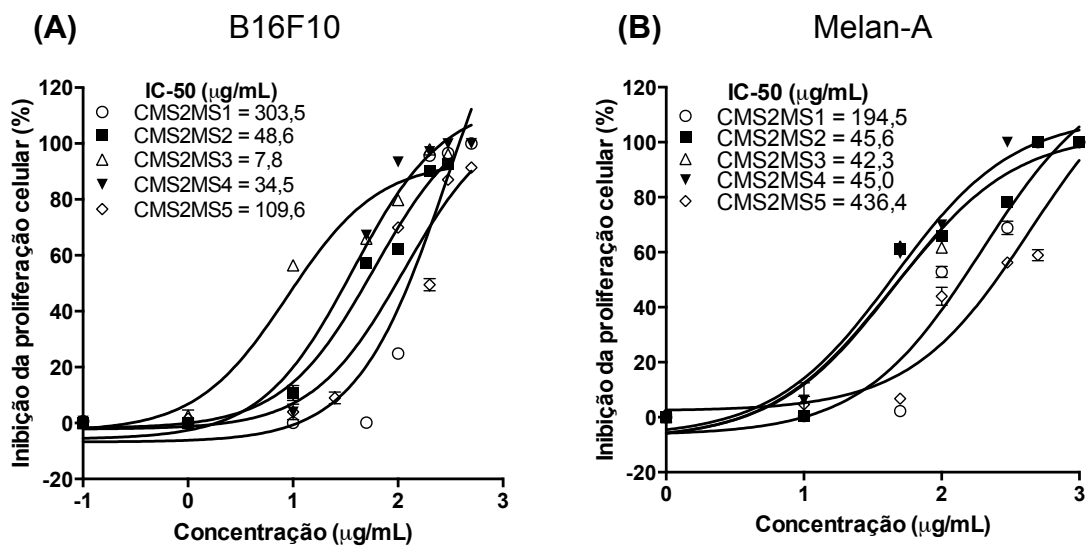
ZETTER BR FAU - CHEN, L. B.; CHEN LB FAU - BUCHANAN, J. M.; BUCHANAN, J. M. Effects of protease treatment on growth, morphology, adhesion, and cell surface proteins of secondary chick embryo fibroblasts. **Cell**, v. 7, n. 3, p. 407-412, 1976.

ZHANG, X. D.; GILLESPIE, S. K.; HERSEY, P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 187-197, 2004.

ZHONG, X.; RESCORLA, F. J. Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: Understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 2, p. 393-401, 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Efeito das proteases sobre a viabilidade celular



Inibição da viabilidade celular. Células B16F10 (A) ou Melan-A (B) foram expostas por 72h a concentrações crescentes das frações, sendo a viabilidade celular determinada pela metabolização da resazurina. (B16F10 – melanoma metastático murinho e Melan-A – melanócito).

APÊNDICE B – Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UFMG

Senhor(a) Professor(a) Miriam Teresa Paz Lopes,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA DE FRACOES DO LATEX DE VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS SOBRE MODELO MURINO DE MELANOMA B16F10, submetido a esta comissão pelo protocolo 229 / 2013, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 17/08/2015.

Para acessar ao seu projeto clique no link:
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>
Belo Horizonte, 18/08/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br