



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Genética e Bioquímica

LaB1Tox

Efeito antitumoral de um inibidor de PLA₂ de *Crotalus durissus collilineatus* (γ CdcPLI)
pela modulação da via PI3K/Akt em células de câncer de mama

Ma. Sarah Natalie Cirilo Gimenes

Orientadora: Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dra. Daiana Silva Lopes

UBERLÂNDIA-MG

2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Genética e Bioquímica

LaB1Tox

Efeito antitumoral de um inibidor de PLA₂ de *Crotalus durissus collilineatus* (γ CdcPLI)
pela modulação da via PI3K/Akt em células de câncer de mama

Ma. Sarah Natalie Cirilo Gimenes

Orientadora: Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dra. Daiana Silva Lopes

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor em Genética
e Bioquímica (Área
Bioquímica).

UBERLÂNDIA-MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G491e
2017 Gimenes, Sarah Natalie Cirilo, 1989
 Efeito antitumoral de um inibidor de PLA2 de *Crotalus durissus collilineatus* (γ CdcPLI) pela modulação da via PI3K/Akt em células de câncer de mama / Sarah Natalie Cirilo Gimenes. - 2017.
 123 p. : il.

 Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
 Coorientadora: Daiana Silva Lopes.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2017.7>
 Inclui bibliografia.

 1. Bioquímica - Teses. 2. Mamas - Câncer - Teses. 3. Serpente peçonhenta - Veneno - Teses. 4. Inibidores da Angiogênese - Teses. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Lopes, Daiana Silva. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Genética e Bioquímica

LaB1Fox

Efeito antitumoral de um inibidor de PLA₂ de *Crotalus durissus collilineatus* (γ CdcPLI)
pela modulação da via PI3K/Akt em células de câncer de mama

Ma. Sarah Natalie Cirilo Gimenes

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Geraldo Santana Magalhães (Butantan – SP)

Prof. Dr. Andreimar Martins Soares (Fiocruz – AC)

Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart (INGEB – UFU)

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva (ICBIM – UFU)

Data da Defesa: 18/08/2017

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dedicatória

Dedico primeiramente aos animais que foram utilizados na condução deste trabalho, estes cederam suas vidas para que a pesquisa pudesse ser concluída. E nós em todo o momento sentimos gratos e buscamos executar o nosso trabalho com todo o respeito que estes animais merecem.

Dedico aos meus pais, minha irmã Ana Carolina e toda minha família, que estiveram ao meu lado dando todo apoio emocional nesta caminhada. O amor incondicional de vocês me tornou o que sou hoje.

Dedico ainda ao meu lindo sobrinho, meu pequeno “minhoca” que com seu sorriso carinhoso e seu entusiasmo pelas descobertas diárias me inspira a buscar sempre o melhor. Meu amor por todos vocês é eterno.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila uma grande pesquisadora e, sobretudo um enorme ser humano, que desde o começo da minha trajetória no LaBitox aceitou conduzir este novo desafio comigo. Agradeço por todo crescimento profissional que tive o privilégio de ter com você, e o mais importante o enorme crescimento pessoal que só uma mãe pode ensinar e oferecer. O meu eterno obrigado por depositar em mim confiança e nunca desistir, isso faz de você um grande exemplo.

À Dra. Daiana Silva Lopes, uma luz que me co-orientou durante tantos anos. Agradeço por seus ensinamentos, puxões de orelha, cada palavra de apoio, carinho, coragem e incentivo que não me deixaram desistir. Isso faz de você uma grande pesquisadora e melhor amiga.

Às Profas. Dras. Maria Ines Homs-Brandeburgo e Amélia Hamaguchi, que não estão no laboratório, mas desde o começo me deram apoio com ideias e ensinaram o amor à bioquímica. À Profa. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneama Tudini e Profa. Dra. Cássia Regina da Silva pelos valiosos conselhos.

À Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues, por toda sua ajuda incentivando sempre com ideias preciosas, palavras de apoio, carinho, dividindo frustrações e multiplicando as alegrias. Uma grande amiga que a ciência me presenteou.

Profa. Dra. Vera Lúcia de Campos Brites por gentilmente nos ceder as serpentes. Sempre solícita a contribuir com informações novas e ricas, muito obrigada por ter sempre deixado as portas abertas. Nossos resultados não seriam possíveis sem sua colaboração.

Ao Prof. Dr. André Luis Quagliato e a Msc. Thaís Carneiro Santos Rodrigues, que desde o início deste trabalho nos apoiou, sempre solícitos para as coletas de sangue.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart e toda sua equipe que sempre de portas abertas permitiu que grandes oportunidades surgissem para engrandecer este trabalho.

A todos do Laboratório do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva, por toda a ajuda e sempre dispostos a ajudar com ideias incríveis. Samuel, Thaíse, Bruna, Cláudio, meu agradecimento especial.

Às nossas técnicas do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais, Tianinha por toda colaboração com os materiais e manutenção da organização em nosso laboratório. E a Marina (Marininha) por todo suporte dentro do laboratório, com ajudas precisosas, nossa guru da matemática e uma verdadeira amiga.

Ao grupo de pesquisa do LaBiTox, David, Denise, Marília, Vitor, Makswel, Fernanda, Mônica, Lucas, Paulo, Patrícia, por toda ajuda e principalmente pelos momentos de descontração. Agradeço em especial a todos que pessoalmente me ajudaram durante este período, cada um do seu jeito, com sua forma de carinho fizeram o diferencial nos momentos felizes e desafiadores durante estes anos. Todos são a prova de que uma amizade começa com boas gargalhadas.

Aos incríveis pesquisadores da Universidade de Salzburg, Áustria, que tive a honra de conviver durante meu doutorado sanduiche. Profa. Dra. Fátima Ferreira Brizza, Prof. Dr. Peter Brizza e Profa. Dra. Gabriele Gardemaier em especial que gentilmente dividiram seus conhecimentos comigo e agregaram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Às agências de fomento, CNPq, por financiar minha bolsa, CAPES pela bolsa do meu doutoramento sanduiche, FAPEMIG e INCT-Nanobiofarm pelo financiamento deste trabalho.

Por fim, agradeço aos membros da banca, Prof. Dr. Geraldo Santana Magalhães, Prof. Dr. Andreimar Martins Soares, Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart e Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva, que gentilmente aceitaram doar parte de seu tempo para participar e agregar conhecimento a este trabalho.

Lista de Figuras

Figura 1 - Principais marcadores de progressão tumoral.	16
Figura 2 - Diferentes mecanismos de ação de sPLA ₂ s no câncer.	28
Figura 3 - Representação esquemática <i>in silico</i> de inibidores de PLA ₂ do tipo gama.	32
Figura 4 - Purificação do inibidor de PLA ₂ γ CdcPLI	52
Figura 5 - Sequência completa do inibidor de PLA ₂ γ CdcPLI obtida por Espectrometria de massas (<i>Macro Mass Global Ultima Q-TOF – Quadrupole Time of Flight</i>).	53
Figura 6 - Alinhamento das sequências de aminoácidos de inibidores do tipo γ .	54
Figura 7 - Quantificação de Prostaglandina E2 liberada por células endoteliais murinas (t-End).	55
Figura 8 - Análise da liberação de citocinas pró-inflamatórias em células t-End e Macrófago Peritoneal de murinos (MPAC).	57
Figura 9 - Análise da formação de edema em pata de camundongos e quantificação de Prostaglandina E2 no macerado de pata.	59
Figura 10 - Citotoxicidade induzida pelo γ CdcPLI em diferentes linhagens de células tumorais humanas, avaliada pelo ensaio de MTT.	61
Figura 11 - Apoptose em células tumorais de mama (MDA-MB-231) após tratamento com o inibidor γ CdcPLI.	63
Figura 12 - Expressão de genes e proteínas envolvidos na via de apoptose em células de mama MDA-MB-231.	65
Figura 13 - Efeito do γ CdcPLI na adesão celular das células MDA-MB-231.	66
Figura 14 - Inibição da migração celular pela técnica de <i>Wound healing</i> .	67
Figura 15 – Inibição da migração celular pela técnica de <i>Transwell</i> .	68
Figura 16 - Inibição da invasão celular pela técnica de <i>Transwell</i> .	70
Figura 17 - Modulação da expressão de genes e proteínas envolvidas com metástase celular.	72
Figura 18 - Citotoxicidade em células endoteliais humanas (HUVEC).	73

Figura 19 - Inibição da adesão e migração de células endoteliais humanas (HUVEC) pela técnica de <i>Transwell</i> .	75
Figura 20 - Análise da expressão de genes e proteínas envolvidos na angiogênese.	77
Figura 21 - Inibição da formação de vasos <i>in vitro</i> por células endoteliais humanas (HUVEC).	79
Figura 22 - Inibição da angiogênese pelo modelo <i>ex vivo</i> (<i>Aortic ring assay</i>).	80
Figura 23 - Quantificação dos níveis de Prostanóides liberados pelas células MDA-MB-231.	81
Figura 24 - Expressão de genes e proteínas envolvidos na via PI3K/AKT em células MDA-MB-231.	82
Figura 25 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de um PLA ₂ secretória humana com a PLA ₂ BnSP-7	84
Figura 26 - Modelo representativo de algumas vias de sinalização em células de câncer de mama (MDA-MB-231) que podem ser moduladas pelo inibidor de PLA ₂ γ CdcPLI.	95

Lista de Tabela

Tabela 1: Valores de IC₅₀ para diferentes linhagens de células tumorais

59

Lista de Abreviatura

APAF-1 – Fator de ativação de apoptose 1

Akt – Proteína Quinase B

BRCA2 – Receptor de câncer de mama tipo 2

BFGF – Fator básico de crescimento de fibroblasto

CA – Subunidade A da crotoxina

CACB – Complexo crotoxina

CB – Subunidade B da crotoxina

CEUA – Comitê de Ética em Utilização Animal

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX2 – Cicloxigenase 2

cPLA2 – Fosfolipase A2 citosólica

CRD – Domínio de Reconhecimento de Carboidrato

ECM – Matriz Extracelular

HER2 – Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

iPLA2 - Fosfolipase Cálcio independente

LTB4 – Leucotrieno B4

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

MDM2 – *Nuclear-localized E3 Ubiquitin Ligase*

NHS - N-hydroxysuccinimide

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAF-AH – Acetilhidrolases fator de agregação plaquetária

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

PGE2 – Prostaglandina E2

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PLIs – Inibidor de Fosfolipase A₂

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase

RT/PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SFB – Soro fetal bovino

sPLA₂ – Fosfolipase A₂ secretória

TEMED – Tetramethylethylenediamine

tEnd – *Thymic endothelium cell*

TNF – Fator de crescimento tumoral

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

WHO - Organização Mundial de Saúde

αPLI – Inibidor de PLA₂ da classe α

βPLI – Inibidor de PLA₂ da classe β

γPLI – Inibidor de PLA₂ da classe γ

Sumário

Abstract	09
Resumo	10
Introdução	11
<i>Câncer: Aspectos epidemiológicos e carcinogênicos</i>	11
<i>Aspectos moleculares do câncer</i>	16
<i>Apoptose e resistência das células tumorais à morte programada</i>	16
<i>Metástase celular</i>	19
<i>Angiogênese Tumoral</i>	20
<i>Câncer de mama</i>	22
<i>Fosfolipases A₂ e seu envolvimento na progressão tumoral</i>	24
<i>Inibidores de PLA₂ e seu potencial terapêutico</i>	26
Objetivos	
<i>Objetivos específicos</i>	33
Materiais e Métodos	
<i>Animais</i>	34
<i>Purificação do inibidor γCdcPLI</i>	34
<i>Avaliação do efeito antitumoral, antimetastático e antiangiogênico do γCdcPLI</i>	39
<i>Estatística</i>	50
Resultados	
<i>Obtenção e sequenciamento do inibidor γCdcPLI</i>	51
<i>Inibição da liberação de PGE₂ por células murinas pela ação do γCdcPLI</i>	54
<i>Efeito Antitumoral do Inibidor de PLA₂ γCdcPLI</i>	60
<i>Análise do efeito antimetastático do inibidor γCdcPLI</i>	66
<i>Análise do efeito antiangiogênico do inibidor γCdcPLI em células endoteliais humana (HUVEC)</i>	73
<i>Efeito do inibidor γCdcPLI na via sinalização de Fosfolipase A₂ (PLA₂)</i>	80
Discussão	83
Conclusão	96
Referências	98
Apêndice	120

Abstract

Phospholipases A₂ (PLA₂s) overexpression is closely associated with the malignant potential of breast cancers. Here, we showed for the first time the antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA₂ inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 cell. Firstly, γ CdcPLI was more cytotoxic to MDA-MB-231 breast cancer cells than other cell lines (MCF-7, HeLa, PC3 and A549) and did not affect the viability of non-tumorigenic breast cell (MCF 10A). In addition, γ CdcPLI induced modulation of important mediators of apoptosis pathways such as p53, MAPK-ERK, BIRC5 and MDM2. γ CdcPLI decreased MDA-MB-231 adhesion, migration and invasion. Interestingly, the γ CdcPLI also inhibited the adhesion and migration of endothelial cells and blocked angiogenesis by inhibiting tube formation by HUVECs *in vitro* and sprouting elongation on aortic ring assay *ex vivo*. Moreover, γ CdcPLI reduced the production of vascular endothelial growth factor (VEGF). γ CdcPLI was also able to decrease PGE₂ levels in MDA-MB-231 and inhibited gene and protein expression of the PI3K/Akt pathway. Furthermore, γ CdcPLI inhibited the proinflammatory effects of BnSP-7, a PLA₂ *Bothrops pauloensis* of snake venom. Thus the effects of γ CdcPLI in PI3K / AKT pathway can be correlated to a possible interaction between the inhibitor and endogenous PLA₂s. Thus, we concluded that γ CdcPLI showed *in vitro* antitumoral, antimetastatic and anti-angiogenic potential effects and could be an attractive approach for futures studies in cancer therapy.

Keywords: PLA₂ inhibitor, snake serum, breast cancer, anti-angiogenic, PI3K/Akt pathway

Resumo

A alta expressão de fosfolipases A₂ (PLA₂) está diretamente associada ao potencial de malignidade do câncer de mama. Neste trabalho mostramos pela primeira vez o efeito antitumoral do γ CdcPLI, um inibidor de PLA₂ isolado do soro da serpente *Crotalus durissus collilineatus*, pela via do PI3K/Akt em células MDA-MB-231. Primeiramente, o γ CdcPLI foi mais citotóxico para as células de câncer de mama MDA-MB-231 do que para outras linhagens celulares (MCF-7, HeLa, PC3 e A549) e não afetou a viabilidade das células de mama não-tumorais (MCF 10A). Além disso, o γ CdcPLI induziu a modulação de importantes mediadores da via de apoptose, como o p53, MAPK/ERK, BIRC5 e MDM2. Interessantemente, o γ CdcPLI inibiu a adesão e migração de células endoteliais humanas e bloqueou a angiogênese por diminuir a formação de vasos em células HUVEC (*in vitro*) e formação de prolongamentos celulares em modelo *ex vivo* de fragmento de aorta, além de reduzir a produção de fator de crescimento endotelial (VEGF). O γ CdcPLI foi também capaz de diminuir os níveis de PGE₂ nas células MDA-MB-231 e inibiu a expressão de genes e proteínas da via de sinalização do PI3K/Akt. Além disso, o γ CdcPLI inibiu os efeitos pro-inflamatórios da BnSP-7, uma PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Assim, os efeitos de γ CdcPLI na via PI3K/AKT podem ser correlacionados com uma possível interação entre o inibidor e as PLA₂ endógenas. Assim, concluímos que o γ CdcPLI apresenta um efeito antitumoral, antimestático e antiangiogênico *in vitro* e possui um potencial para o uso como modelo farmacológico para terapia antitumoral.

Palavras-Chave: Inibidor de PLA₂, soro de serpentes, câncer de mama, antiangiogênese, via do PI3K/Akt.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: Aspectos epidemiológicos e carcinogênicos

Diversos fatores podem classificar o câncer como um problema de saúde pública devido à sua alta incidência, prevalência, mortalidade e principalmente os elevados custos hospitalares durante o tratamento. Segundo estimativas publicadas pela Agência Internacional de Pesquisa com Câncer (GLOBOCAN), anualmente cerca de 6 milhões de óbitos são registrados em todo o mundo, sendo que projeções recentes indicam que em 2034 este número possa atingir 22 milhões. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) o câncer de pulmão é o que apresenta maior prevalência de casos, atingindo 13% do total mundial, sendo seguido pelo câncer de mama com 11,9% e 9,7% o câncer de cólon (Ferlay *et al.*, 2015; Siegel *et al.*, 2016).

Atualmente o câncer de mama é o que apresenta maior prevalência e mortalidade entre as mulheres em todo o mundo. Dados publicados pela GLOBOCAN apontaram que em 2012 a incidência mundial de câncer de mama foi de 1,67 milhões de casos, com 522 mil mortes. Pesquisas recentes publicadas pela *National Center for Health Statistics* indicaram que somente no território Norte Americano foram projetados 250 mil novos casos com 41 mil mortes no ano de 2016. Estes valores tendem a um aumento ainda maior com estimativas globais de que até o ano de 2050 os novos casos registrados atinjam 3,2 milhões em todo o mundo (Siegel *et al.*, 2016). Outras pesquisas revelam ainda que a prevalência do câncer de mama no mundo ocorre em maior proporção em países desenvolvidos, com aproximadamente 50% dos casos de câncer de mama, porém, as maiores porcentagens de morte, cerca de 58%, ocorrem em países em desenvolvimento (Ferlay *et al.*, 2015).

No Brasil pesquisas realizadas pelo Instituto Nacional de Câncer - José Alencar Gomes da Silva (INCA) revelaram que em 2016 ocorreram 58 mil novos casos de câncer de mama, com um risco calculado de 56,20 novos casos para cada 100 mil mulheres brasileiras. Entre os homens esse risco também é descrito, porém em incidência menor que em mulheres, com cerca de 50 novos casos registrados no ano de 2014 (Ferlay *et al.*, 2015) (Brasil, 2015; Inca, 2014; WHO, 2015).

Os diferentes tipos de cânceres podem ser classificados de acordo com o tecido ou tipo celular ao qual foi derivado. Tumores originados de células epiteliais são considerados os mais comuns entre os seres humanos, sendo denominados de carcinoma. Quando derivados do tecido conectivo ou muscular são chamados de sarcoma, e podem se desenvolver em ossos e músculos. Existem também outros tipos de cânceres que incluem a leucemia e linfomas, derivados das células de linhagem branca ou de suas precursoras (células hematopoiéticas), assim como os cânceres do sistema nervoso central (SNC) que englobam os tumores que se originam no cérebro e na medula espinhal (Inca, 2014b).

O câncer pode ser desencadeado por diversos fatores extrínsecos (tabagismo, consumo excessivo de álcool, má alimentação) e intrínsecos ao indivíduo, tais como danos no reparo do DNA, pré-disposição genética, disfunções hormonais, dentre outros (WHO, 2015). Destaca-se que dependendo do grau de malignidade dos tumores, por características particulares de algumas células, estes podem migrar e invadir diferentes tecidos próximos ou distantes do local de origem, nestes casos o índice de mortalidade aumenta em decorrência da dificuldade no tratamento (Ruddon, 2010).

As células cancerosas apresentam propriedades diferenciadas em relação às células normais, como capacidade anormal de divisão celular, sustentação de sinalização proliferativa, evasão da ação de supressores de crescimento tumoral,

resistência à morte celular, angiogênese, invasão e progressão tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011). A figura 1 descreve os principais marcadores tumorais, conhecidos como **Marcadores do Câncer** (*Hallmarks of cancer*) (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Tais propriedades resultam na formação de um tumor, ou neoplasia. O tumor somente é considerado benigno quando as células não apresentam sinais de invasão para outros tecidos. Quando as células adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes ou distantes, o tumor torna-se maligno. Quando inicia-se a progressão tumoral, a erradicação da doença é considerada muito difícil, podendo resultar na morte do paciente (Balogun e Formenti, 2015).

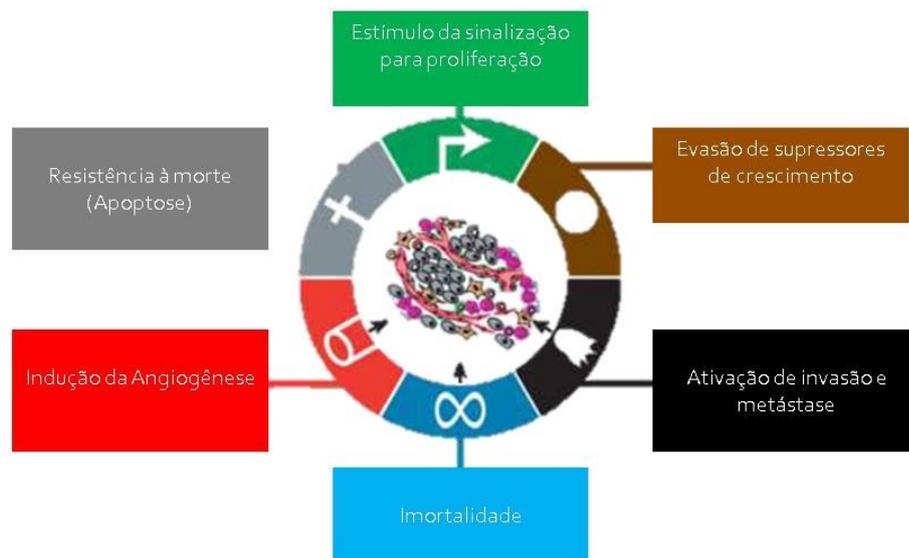


Figura 1: Principais marcadores de progressão tumoral. Quadro verde: Sinalização da proliferação; Quadro marrom: Evasão dos supressores de crescimento; Quadro Preto: Ativação da invasão e metástase; Quadro azul: Capacidade de replicar a imortalidade; Quadro vermelho: indução da angiogênese; Quadro cinza: resistência à morte celular. Fonte: Hanahan e Weinberg, 2011.

A carcinogênese é um processo que engloba múltiplos passos, onde alterações genéticas e cromossômicas acumulam-se em uma célula, dando origem ao desenvolvimento tumoral (Boyd, 2014). Alterações genéticas podem ocorrer por genes reguladores do crescimento divididos em dois grupos, os genes de supressão tumoral e os genes conhecidos como protooncogenes. Os genes de supressão tumoral atuam inibindo o crescimento celular, enquanto que os protooncogenes, de forma antagônica, são responsáveis pelo crescimento celular (Elenbaas *et al.*, 2001; Hosny *et al.*, 2016). Em destaque, os protooncogenes quando apresentam alguma mutação somática, tais como amplificação, translocação ou mutações pontuais, tornam-se genes oncogenes. Estes estão diretamente relacionados com o surgimento de tumores malignos ou benignos (Serrano *et al.*, 2014). Alguns dos principais oncogenes descritos são: **B-RAF** (B-Raf protooncogene, serina/treonina quinase) responsável pela sinalização intracelular, encontrado expresso em células de melanoma; o gene **RAS** (gene de resistência a ataques autoagênicos) responsável pela sinalização celular controlando a proliferação, diferenciação e sobrevivência, expresso em células de câncer colorretal; o **HER2** (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano) responsável por expressar receptores para fatores de crescimento celular, encontrado em células do câncer de mama (Pierotti *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2014; Hosny *et al.*, 2016).

Diferentes mecanismos genéticos são descritos na literatura capazes de ativar estes oncogenes, possibilitando assim um aumento da expressão em células tumorais. Estes mecanismos podem ser agrupados em três grupos: amplificação gênica, mutação espontânea e rearranjos cromossômicos (Barrett, 1993; Pierotti *et al.*, 2003; Margan *et al.*, 2016). A amplificação gênica é caracterizada por apresentar uma reduplicação do material genético, produzindo assim diversas cópias de protooncogenes nestas células tumorais. Este fator confere às neoplasias o perfil de malignidade, uma vez que aumenta

a expressão de genes mutados (Margan *et al.*, 2016). As mutações espontâneas por sua vez são promovidas por agentes que originam danos no material genético e ativam os oncogenes para as traduções de proteínas pró-tumorais. Estas proteínas são responsáveis pelo desencadeamento de processos celulares, como a proliferação e diferenciação celular, o controle de apoptose, dentre outros. Por fim, os rearranjos cromossômicos são responsáveis pela inserção ou translocação cromossômica, que também resultam no aumento desordenado da expressão de protooncogenes e por consequência proteínas pró-oncogênicas (Pierotti *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2014; Margan *et al.*, 2016).

A instalação tumoral completa passa por algumas fases com características particulares em cada uma delas, como a iniciação, promoção e progressão. Na fase de iniciação a principal característica são as ativações dos genes e proteínas oncogênicas. Sendo estes os principais responsáveis pela multiplicação desordenada destas células (Almeida *et al.*, 2005; Vincent e Gatenby, 2008; Tanaka *et al.*, 2013; Arruda Macedo *et al.*, 2015). Na fase de promoção a característica particular é a expansão celular, que resulta na geração de tumores potencialmente malignos. Esta fase ocorre de forma lenta e caso a exposição aos agentes pró-tumorais cessem ainda há a possibilidade de regressão do processo tumoral. Outra importante ocorrência nesta fase é a angiogênese, sendo essencial para nutrir as células tumorais com oxigênio e nutrientes (Ward, 2002; Almeida *et al.*, 2005; Vincent e Gatenby, 2008; Tanaka *et al.*, 2013; Arruda Macedo *et al.*, 2015). Nesta etapa de progressão ocorre a malignização das células tumorais, resultante do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que ocorreram desde a fase de iniciação resultando nas primeiras manifestações clínicas dos tumores. Nesta última fase as células estão preparadas para iniciar o processo de progressão celular que incluem a migração, invasão, adesão à parede vascular, extravasamento e difusão em

um novo tecido hospedeiro (Ward, 2002; Almeida *et al.*, 2005; Vincent e Gatenby, 2008; Tanaka *et al.*, 2013; Arruda Macedo *et al.*, 2015).

1.2 Aspectos moleculares do câncer

1.2.1 Apoptose e resistência das células tumorais à morte programada

O equilíbrio natural da homeostase tecidual é dependente de diferentes fatores capazes de regular a proliferação, diferenciação, indução de morte e capacidade de sobrevivência. A classificação da morte celular natural é atribuída de acordo com as características bioquímicas e morfológicas, como a apoptose, necrose e senescência celular, sendo que quaisquer mutações que ocorram neste processo ocasionam a formação tumoral (Kerr *et al.*, 1972).

Dentre as mortes celulares programadas, a apoptose é considerada uma morte celular pré-programada geneticamente, que demanda um gasto energético para sua execução (Hengartner, 2000; Frame *et al.*, 2016). Alguns fatores podem desencadear uma resposta para a ativação da apoptose, como estresse oxidativo, lesões no DNA, citotoxicidade, dentre outros. Ao final do processo de apoptose os restos celulares são fagocitados por macrófagos, e neste caso não há extravasamento celular, logo o dano tecidual não ocorre (Kerr *et al.*, 1972; Knizhnik *et al.*, 2013; Nunes e Bernardazzi, 2014). Enquanto que na necrose celular ocorrem algumas mudanças morfológicas nas células, como formação de vacúolos citoplasmático, distensão do retículo endoplasmático, condensação celular, ruptura de estruturas celulares (mitocôndria e lisossomos), e principalmente ruptura da integridade da membrana celular, que libera conteúdo citoplasmático no tecido adjacente atuando como agente quimiostático com recrutamento de células inflamatórias (Majno e Joris, 1995; Trump *et al.*, 1997).

O processo apoptótico celular pode ocorrer por duas vias, via extrínseca e via intrínseca. A via extrínseca é desencadeada por receptores transmembranares tais como TNFR-1 ou Fas. Estes possuem um domínio denominado *Domínio de morte*, conhecido como DD (*Death domain*) o qual difunde o sinal pró-apoptótico ativando a via das caspases (Indran *et al.*, 2011; Galluzzi *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2012). A ativação da Caspase-8 dá origem a um complexo de sinalização conhecido como Complexo de Sinalização para a Indução de Morte (DISC - *Death-inducing signalling complex*). O complexo DISC desencadeia a ativação de caspases efetoras (Caspase-3, 6 e 7), finalizando assim a ativação da apoptose celular (Cardone *et al.*, 1998; Indran *et al.*, 2011; Nunes e Bernardazzi, 2014).

A via intrínseca por sua vez é ativada por diferentes estímulos intracelulares, como dano no material genético, radiação, ativação de oncogenes, hipóxia, dentre outros. Tais alterações ocasionam modificações da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, desencadeando a perda do potencial de membrana e interrupção da síntese de ATP, além da liberação de proteínas pró-apoptóticas e elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Li *et al.*, 1997; Galluzzi *et al.*, 2012).

As proteínas pró-apoptóticas podem ser divididas em dois grupos: o primeiro grupo representa as proteínas que induzem a apoptose por vias dependentes de caspases, como por exemplo, o Citocromo C. Estas proteínas apresentam como principal característica inibir a função antiapoptótica nas células. Para ilustrar, o Citocromo C quando liberado no citosol interage com a proteína adaptadora (Apaf-1), por sua região C-terminal, e a partir desta interação facilita a ligação do dATP com a pró-caspase 9, formando então o complexo conhecido como Apoptossomo. Em seguida a ativação da Caspase 9, por clivagem proteolítica, ativa por um efeito em cascata outras caspases e por conseguinte a progressão da apoptose celular (Marusawa *et al.*, 2003; Williams e

Cook, 2015). O segundo grupo é representado pelas proteínas que ativam a apoptose por vias independentes de caspases, como por exemplo, fatores de indução de apoptose (AIF) e endonuclease G (EndoG). Estas proteínas (AIF e EndoG) após liberação pela mitocôndria são translocadas para o núcleo celular para fragmentação do DNA (Indran *et al.*, 2011; Miyamoto *et al.*, 2017).

A via apoptótica mitocondrial é regulada por membros da família Bcl-2, que regulam a liberação do Citocromo C, esta família é constituída por componentes antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1) e pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Hrk, Puma e Noxa). Dessa forma, estas proteínas podem ser consideradas indutoras e repressoras de morte celular por apoptose, uma vez que participam diretamente desta regulação. Os estímulos resultantes do dano ao material genético elevam a produção de proteínas pró-apoptóticas, desencadeando assim todo o processo de apoptose celular pela via intrínseca (Elmore, 2007; Indran *et al.*, 2011; Galluzzi *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2012; Williams e Cook, 2015).

A apoptose sendo então caracterizada como um processo controlado geneticamente é suscetível à interrupções pela ocorrência de mutações (Thompson, 1995). Portanto, é sabido da incapacidade de células tumorais em sofrer apoptose, por apresentar alterações no DNA e modulação na expressão de genes e proteínas que vão favorecer a evasão dos mecanismos intrínsecos e extrínsecos da apoptose, tais como a modulação da expressão de genes e proteínas envolvidos nas vias de sobrevivência (PI3K/Akt, NFκB) e de supressores tumorais como a proteína p53 (Lowe *et al.*, 1993; Thompson, 1995; Hengartner, 2000).

A relação entre o processo da carcinogênese e a desregulação da apoptose é tão próxima, que qualquer método de tratamento que busque estimular especificamente a indução da apoptose em células tumorais podem ter potencial para o sucesso do

tratamento (Borner *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2014). Assim, todos os anos aumentam o número de pesquisas que buscam encontrar novos métodos de tratamento para o câncer capazes de estimular a apoptose destas células (Borner *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2014).

1.2.2 Metástase celular

O processo de metástase celular é responsável por aumentar a malignidade do câncer, além de estar associada com os altos índices de mortalidade. Este processo requisita alguns mecanismos moleculares para seu estabelecimento, como adesão, migração e invasão celular (Gupta *et al.*, 2004). Dessa forma, a metástase pode ser conceituada como a migração das células tumorais a partir do tumor primário após entrar no estroma local e invadir o sistema linfático e/ou circulatório, tornando capazes de interagir com endotélios distantes do local de origem, extravasamento e colonização deste novo sítio (Coleman e Rubens, 1987).

Células normais não são capazes de entrar em processo de metástase por não apresentar habilidades particulares para esta execução. Tais células apresentam proteínas membranares que garantem a integridade celular e permitem a adesão célula-célula, como por exemplo, as E-Caderinas (Cavallaro e Christofori, 2004; Gupta e Massague, 2006). Visto isso, as células tumorais precisam de algumas mudanças genéticas e fenotípicas para adquirirem a capacidade metastática. Primeiramente, para a invasão celular as células precisam ultrapassar o epitélio normal, considerado uma barreira intrínseca para a invasão (Hu *et al.*, 2008; Hanahan e Weinberg, 2011; Valastyan e Weinberg, 2011). Em seguida, ativam o Mecanismo de Transição Epitélio Mesenquimal (EMT), importante processo na progressão tumoral e alvo para estudos terapêuticos, é controlado por fatores de transcrição que respondem aos estímulos como

do TFG β (Fator de Transformação do Crescimento) (Klaus e Birchmeier, 2008; Shibue e Weinberg, 2017). A somatória destes eventos proporcionam conjuntamente alterações dos perfis de expressão de proteínas membranares, como diminuição de E-Caderina e aumento de N-Caderina ou vimentina, integrinas, receptores de laminina e fibronectina, metaloproteases de matriz (MMPs) e outras enzimas proteolíticas. O aumento da expressão de metaloproteases, por exemplo, auxiliam no processo de migração por destruir a Matriz Extracelular (ECM) (Felding-Habermann, 2003; Guo e Giancotti, 2004; Yang *et al.*, 2004; Bohl *et al.*, 2014; Seguin *et al.*, 2015).

As células tumorais durante o processo metastático perdem a capacidade de adesão célula-célula, penetram na circulação (sanguínea ou linfática), burlando mecanismos de vigilância imunológica, migram para tecidos com tropismo e neste ponto danificam a membrana basal e a ECM. Em alguns casos as células tumorais produzem quimioatratores plaquetários, incorporando plaquetas na superfície tumoral, dessa forma ocultando-se do sistema imunológico e fornecendo fatores para a sobrevivência celular na circulação (Ward, 2002; Talmadge e Fidler, 2010).

1.2.3 Angiogênese tumoral

A angiogênese é um processo natural e complexo no organismo, envolvendo diversas etapas como ativação endotelial, ruptura da membrana basal, invasão da matriz extracelular por brotamentos endoteliais que se desenvolvem a partir dos vasos pré-existentes e por fim o remodelamento completo do novo vaso (Kumar *et al.*, 1998). Este processo é regulado pelo equilíbrio entre fatores pró- e anti-angiogênicos, como por exemplo, Fator de Crescimento Vascular (VEGF) e Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico (bFGF), angiopoietinas, dentre outros. Este processo ocorre

naturalmente durante o desenvolvimento embrionário, bem como na reparação de tecidos (Nicosia *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1998).

Na angiogênese tumoral ocorre um desequilíbrio entre os fatores pró- e anti-angiogênicos, o que possibilita o desenvolvimento dos vasos sanguíneos desordenadamente. Como em todo processo desordenado no câncer, a angiogênese tumoral é um processo complexo que recruta uma sequência de interações entre as células endoteliais saudáveis com as células tumorais. Estas interações garantem o fornecimento de nutrientes e oxigênio para o crescimento tumoral, além disso, a formação de vasos adjacentes ao tumor primário facilita o processo metastático (Papetti e Herman, 2002) (Nishida *et al.*, 2006).

Os fatores pró-angiogênicos são reconhecidos por receptores presentes na superfície de células endoteliais e assim iniciam uma cascata de sinalização para a proliferação, migração e formação dos novos capilares. A angiogênese pode então ser dividida em algumas etapas, primeiramente o aumento da permeabilidade vascular e, por conseguinte a remoção dos pericitos, degradação da matriz extracelular, migração e proliferação das células endoteliais, formação de novos tubos, maturação celular e por fim o recrutamento de novos pericitos (Carmeliet e Jain, 2000; Folkman, 2002).

Dessa forma no início do processo angiogênico no câncer, as células tumorais expressam fatores pró-angiogênicos para a ativação das células endoteliais, em seguida ocorre a degradação da matriz extracelular por proteases expressas pelas células endoteliais e tumorais. Após a migração e proliferação das células endoteliais ocorre uma ligação entre estas células denominada *tip cells*, no qual as células endoteliais originadas nos novos capilares criam um microambiente favorável para o seu estabelecimento, com um novo lúmen e uma nova membrana basal (Grizzi *et al.*, 2005; Weis e Cheresh, 2011).

O papel fundamental da angiogênese na sobrevivência e progressão tumoral abriram novas perspectivas para o desenvolvimento de novos compostos antiangiogênicos para combinação com tratamentos preconizados para o câncer. Com isso, diversas terapias com esta associação estão em testes pré-clínicos de desenvolvimento (Castaneda-Gill e Vishwanatha, 2016). Em 2004, foi aprovado o tratamento de pacientes com câncer de colo retal a associação da quimioterapia com a administração de um composto antiangiogênico, o Avastin (Bevacizumabe) (Ocana *et al.*, 2011). Atualmente as abordagens mais exploradas têm como alvo atuar sobre o VEGF, seja bloqueando seu funcionamento ou mesmo sua ligação à receptores (VEGFR) (Heath e Bicknell, 2009; Cesca *et al.*, 2013).

1.3 Câncer de mama

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea de acordo com suas características patológicas, sendo que seu acompanhamento é bastante complexo devido à existência dos diversos subtipos, dos quais possuem perfil de expressão, resposta terapêutica e comportamentos clínicos diferentes (Ferlay *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2015; Tomao *et al.*, 2015; Russnes *et al.*, 2017).

O câncer de mama só pode ser classificado como hereditário quando caracterizado por mutações herdadas de parentais, no qual envolvem oncogenes que atuam direta ou indiretamente no reparo do DNA como, por exemplo, os genes BCRA1, BCRA2, TP53, ATM e CHEK2 (Bogdanova *et al.*, 2013; Boyd, 2014). Dessa forma, a partir do ano de 2001 foi adotada pela comunidade médica-científica uma nova classificação, no qual o carcinoma mamário pôde ser distribuído entre 4 principais e mais explorados subgrupos moleculares, a saber: **luminal A**, é o mais frequente e apresenta alta expressão de receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona

(RP), com baixos índices de proliferação celular; o subgrupo **luminal B**, diferencia do Luminal A por apresentar maior índice de proliferação celular; o subgrupo **Her-2** (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), é negativo para expressão de receptores e possui elevada expressão de Her-2, um gene pró tumoral, sendo associado ao perfil metastático, apresentando alta taxa de proliferação celular; por fim o subgrupo **basal-like**, considerado o subtipo mais agressivo e metastático, sendo que grande parte dos casos não apresenta expressão de nenhum dos marcadores para prognósticos, como receptores ou Her-2, fato este que dificulta o tratamento. Cada um destes subgrupos é reconhecido por constituir um conjunto de neoplasias com semelhanças no que se refere aos genes alterados e com características imuno-histoquímicas, prognósticas e terapêuticas distintas (Eisen e Brown, 1999; Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2006; Sarrio *et al.*, 2008; Kao *et al.*, 2011; Voss *et al.*, 2011; Tomao *et al.*, 2015).

Durante os últimos dez anos pesquisas relacionadas ao câncer de mama tem avançado e demonstrado que os aspectos moleculares estão relacionados principalmente com a perda de inibição do contato celular, a insensibilidade aos sinais de crescimento e principalmente a resistência a apoptose (Hunter, 2004; Hunter *et al.*, 2008; Mohankumar *et al.*, 2014; Siegel *et al.*, 2014; Noubissi *et al.*, 2015).

A sobrevivência e a proliferação do câncer de mama têm sido atribuídas principalmente, dentre outros fatores, a atividade pró-inflamatória de fosfolipases A₂. Tais enzimas são altamente expressas neste e demais tipos de cânceres (Panel *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2008). Em células de câncer de mama estudos demonstram que PLA₂s associadas à membrana plasmática (M-PLA₂) também atuam na progressão da doença (Yamashita *et al.*, 1994; Sorlie *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2011; Pucer *et al.*, 2013; Brglez, Lambeau, *et al.*, 2014). Pode-se dizer então que as

fosfolipases A₂ desempenham um papel importante no estabelecimento e progressão do câncer (Yamashita *et al.*, 1994; Cummings *et al.*, 2000; Yarla *et al.*, 2016).

1.4 Fosfolipases A₂ e seu envolvimento na progressão tumoral

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) (E.C. 3.1.1.4) são enzimas capazes de hidrolisar especificamente a ligação 2-acil éster de 2-*sn*-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (ARNI e WARD, 1996; KINI *et al.*, 2003). Estas enzimas estão envolvidas no catabolismo de lipídeos provenientes da dieta, bem como no metabolismo de lipídeos estruturais de membranas celulares, entre outros mecanismos. (Garcia Denegri *et al.*, 2010). As PLA₂s estão envolvidas em uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos, como doenças inflamatórias, câncer, distúrbios neurológicos, etc. Também estão associadas à fisiopatologia do envenenamento por serpentes, abelhas, aranhas, escorpiões, dentre outros (Burke e Dennis, 2009; Garcia Denegri *et al.*, 2010).

As PLA₂s estão distribuídas em uma superfamília contendo quinze grupos e diversos subgrupos, classificados de acordo com a estrutura, massa molecular e função (Dennis, 1994; Six e Dennis, 2000; Schaloske e Dennis, 2006). Estes grupos incluem as PLA₂s Ca²⁺ independentes (iPLA₂), PAF acetilhidrolases (fator de ativação agregação plaquetária), as lisossômicas, citosólicas (cPLA₂) e as secretórias (sPLA₂) (Schaloske e Dennis, 2006), sendo as duas últimas classes altamente expressas em células tumorais (Bonventre *et al.*, 1997; Nagase *et al.*, 2000; Leslie, 2015).

As PLA₂s citosólicas (cPLA₂) são capazes de hidrolisar preferencialmente glicerofosfolipídeos que contenham ácido araquidônico na posição *sn*-2. As cPLA₂s são agrupadas em quatro subgrupos, sendo eles: GIVA, GIVD, GIVE e GIVF, encontrados

em humanos e murinos. As cPLA₂s do subgrupo GIVA são descritas como responsáveis por diferentes processos inflamatórios no organismo, descritos em diversos trabalhos que demonstraram participação em respostas alérgicas, danos inflamatórios induzidos em modelos de pulmão e cérebro, câncer, dentre outros (Bonventre *et al.*, 1997; Nagase *et al.*, 2000; Leslie, 2015). As sPLA₂s representam o grupo mais diversificado e bem descrito até o momento, sendo subdivididas nos grupos: GIA, GIB, GIIA, GIIB, GIIC, IID, GIIE, GIIF, GIII, GV, GIX, GX, GXIA, GXIB, GXII, GXIII e GXIV. A característica principal comum desta classe é a dependência de íons de Ca₂⁺ em sua catálise e um resíduo de Histidina em seu sítio ativo para realização da ação catalítica, além de possuírem baixo peso molecular e seis pontes dissulfeto conservadas em sua estrutura. Os subgrupos IA (GIA) e IIA (GIIA), encontrados principalmente em peçonhas de serpentes e em células humanas são os mais extensivamente explorados (Scott *et al.*, 1990; White *et al.*, 1990; Fremont *et al.*, 1993; Segelke *et al.*, 1998; Angelo J. Magro, 2003).

As PLA₂s endógenas têm sido descritas como mediadores carcinogênicos devido à atividade metabólica de seus produtos de reação, principalmente ácidos graxos livres, como ácido araquidônico, que por sua vez originam prostanóides. Estes prostanóides estão envolvidos diretamente em diversos mecanismos celulares, como proliferação, sobrevivência, diferenciação, inflamação, além de contribuírem para o estabelecimento e manutenção de importantes estágios do crescimento e metástase tumoral. (Yamashita *et al.*, 1994; Cummings *et al.*, 2000; Hernandez *et al.*, 2010; Brglez, Lambeau, *et al.*, 2014). Os mediadores lipídicos favorecem a malignidade do tumor por meio de ativação de importantes vias de sinalização para a sobrevivência celular, como as vias MAPK, PI3K/Akt e Nf-κβ (Cummings, 2007; Brglez, Pucer, *et al.*, 2014). A figura 2 apresenta como as sPLA₂ podem ativar diferentes vias em células tumorais por ligarem em

receptores de membrana, bem como por atuarem enzimaticamente liberando produtos capazes de desencadear respostas intracelulares que irão promover resistência ao estresse metabólico, crescimento e proliferação celular e principalmente resistência a apoptose. O entendimento dos mecanismos de ação de sPLA₂ na biologia molecular do câncer vem crescendo substancialmente e tais conhecimentos abrem caminhos para a estudos que visam reduzir ou inibir suas ações no câncer (Polyak, 2007; Hunter *et al.*, 2008; Brglez, Lambeau, *et al.*, 2014; Brglez, Pucer, *et al.*, 2014; Noubissi *et al.*, 2015).

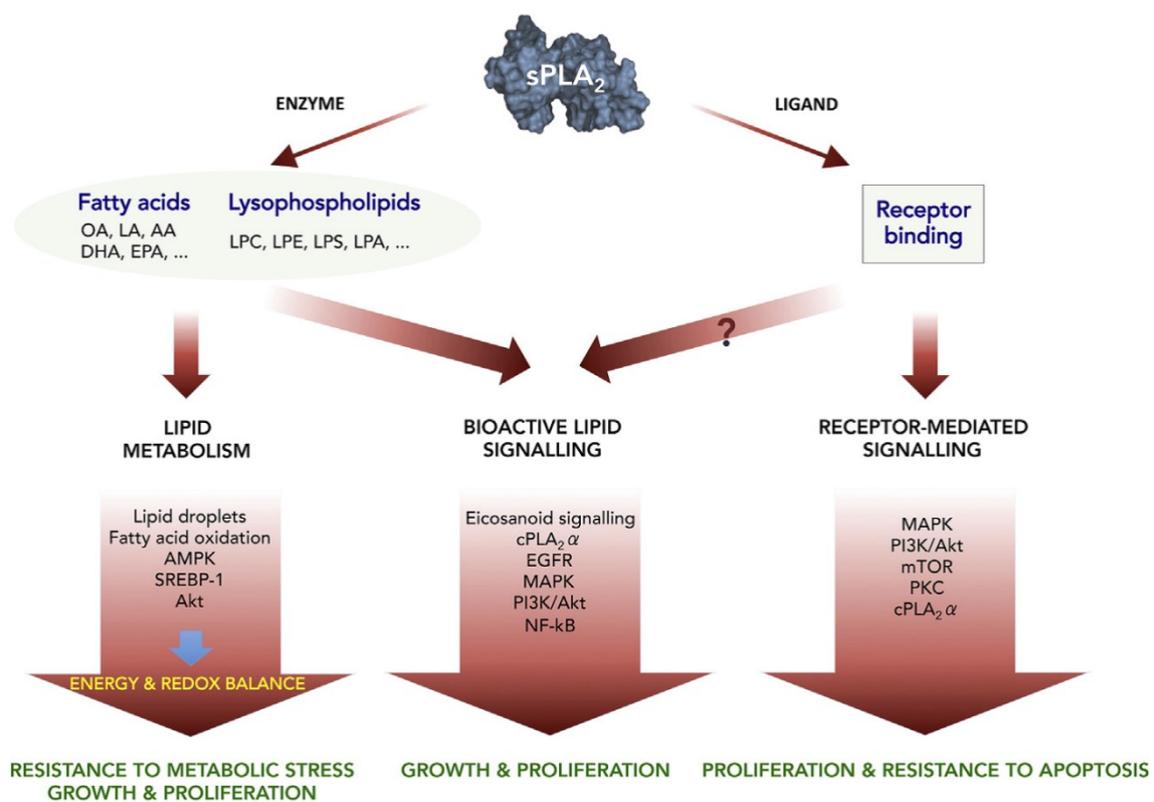


Figura 2: Diferentes mecanismos de ação de sPLA₂s no câncer. FONTE: BRGLEZ; LAMBEAU; PETAN, 2014.

1.5 Inibidores de PLA₂ e seu potencial terapêutico

Inibidores de PLA₂s endógenos (PLIs) têm sido isolados de sangue de diferentes animais, como alguns mamíferos marsupiais com hábitos onívoros (*Didelphis*

marsupialis aurita e *Philander opossum*) e répteis, principalmente serpentes peçonhentas e não peçonhentas (Ovadia e Kochva, 1977; Domont *et al.*, 1991). Os primeiros estudos de purificação e caracterização funcional de PLIs iniciaram em 1976 a partir de um inibidor isolado do plasma da serpente *Trimeresurus flavoviridis* (Kihara, 1976; Lizano, 2003). Atualmente, estes são bem conhecidos na literatura como glicoproteínas ácidas (Okumura *et al.*, 1998; Ohkura *et al.*, 1999; Fortes-Dias *et al.*, 2003; Fortes-Dias *et al.*, 2014; Gimenes *et al.*, 2014) classificadas estruturalmente em três tipos diferentes α , β e γ (Inoue *et al.*, 1991).

Os inibidores da classe α (α PLI) são proteínas globulares constituídas por mais de duas subunidades isoméricas com massa variando de 20 a 25 kDa por subunidade, e com um sítio de N-glicosilação conservado (Lizano, 2003). A característica principal que classifica este grupo é a de possuírem similaridade sequencial com o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), comum em Lectinas tipo-C, domínio este que provavelmente confere a capacidade de reconhecimento e neutralização das PLA₂s (Inoue *et al.*, 1991).

Os inibidores do tipo β (β PLIs) também são constituídos por subunidades proteicas e apresentam como característica principal múltiplas repetições de domínios sucessivos ricos em leucina além de possuírem quatro sítios de N-glicosilação por subunidade e preferencialmente inibem PLA₂s básicas presentes em peçonhas de serpentes. Estudos demonstram também uma homologia de 33% com a α 2-glicoproteína humana, que também é caracterizada pela presença de domínios ricos em leucina (LRRs) (Okumura *et al.*, 1998). Estes domínios ricos em leucina garantem um arranjo para a proteína em formato de ferradura, conhecido como *Horseshoe-shaped motif*, também encontrado em receptores do tipo-Toll (Ohkura *et al.*, 1999; Okumura *et al.*, 2002). Até o momento foram descritos na literatura quatro inibidores do grupo β

encontrados no plasma ou na glândula de peçonha das seguintes serpentes: não peçonhentas *Elaphe climacophora* e *Elaphe quadrivirgata* e outros dois de serpentes peçonhentas *Gloydius brevicaudus* e *Lachesis muta* (Inoue *et al.*, 1991; Okumura *et al.*, 1998; Okumura *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2011). Lima e colaboradores (2011) demonstraram o primeiro caso de inibidor do tipo β encontrado no transcriptoma da glândula de peçonha de uma espécie de serpente *Lachesis muta*, porém o entendimento de sua presença e funcionalidade na peçonha ainda não foram bem esclarecidos.

Os inibidores de PLA₂s do tipo γ (γ PLI) possuem um maior número de subunidades proteicas, com massa molecular variando de 90 a 341 kDa, sendo que cada subunidade ligada não covalentemente apresenta massa de 20 a 31 kDa. Estes possuem ainda um sítio de glicosilação bem conservado na posição 157 (considerando o peptídeo sinal), a presença deste sítio foi descrita para diferentes inibidores purificados do soro/plasma de diferentes espécies de serpentes, como de *Crotalus durissus terrificus* (Fortes-Dias, 1991), *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (Okumura *et al.*, 1998), *Python reticulatus* (Thwin *et al.*, 2002) e *Crotalus durissus collilineatus* (Gimenes *et al.*, 2014).

Alguns autores propõem uma subclassificação da classe γ em duas novas subclasses γ PLI-I e γ PLI-II. Esta subdivisão seria baseada em diferenças nas estruturas quaternárias e nos perfis de inibição destes inibidores (Fortes-Dias, 1999; Lizano *et al.*, 2000; Lizano *et al.*, 2003). Seguindo esta proposta de classificação a classe γ PLI-I seria representada por inibidores que possuem heterodímeros em sua estrutura quaternária, sendo estes comumente encontrados nas serpentes das famílias *Elapidae*, *Hydrophidae* e *Colubridae*. A classe γ PLI-II é constituída por inibidores contendo apenas monômeros, sendo comumente encontrados nas famílias *Crotalidae* e *Viperidae*, dentre outras serpentes do velho mundo (Lizano *et al.*, 2003).

Um importante domínio presente nos inibidores do tipo γ são regiões ricas em prolina (Dunn e Broady, 2001). Estas regiões poderiam desempenhar um papel estrutural protegendo a conformação dos sítios de interação com PLA₂s (Kini e Evans, 1989). Outra característica marcante deste grupo é a presença de dois conjuntos de repetições intramoleculares com domínios ricos em cisteína, denominados motivo *Three-fingers* (Ohkura *et al.*, 1999; Estevao-Costa *et al.*, 2008). Este domínio apresenta grande semelhança com o receptor da uroquinase ativadora de plasminogênio (u-PAR), bem como com algumas α -neurotoxinas. Acredita-se dessa forma que este domínio seja o responsável pelo reconhecimento da região de ligação do Ca₂⁺ de PLA₂s, dado que garante o alto espectro de inibição desta classe em todos os grupos de PLA₂s (IA, IIA e IIIA) sem a preferência de reconhecimento de PLA₂ descrita para os outros dois grupos de inibidores (Fortes-Dias *et al.*, 1994; Dunn e Broady, 2001; Gimenes *et al.*, 2014).

Alguns trabalhos recentes demonstraram por modelagem molecular *in silico* a estrutura tridimensional de inibidores de PLA₂ do grupo gama utilizando a proteína uroquinase ativadora de plasminogênio (u-PAR) como molde (**Figura 3**) (Fortes-Dias *et al.*, 2014; Picelli *et al.*, 2017). Porém sabe-se pouco da conformação tridimensional desta classe de inibidores por não ter sido descrito na literatura até o momento nenhum cristal que elucidie com clareza os sítios de reconhecimento para PLA₂s.

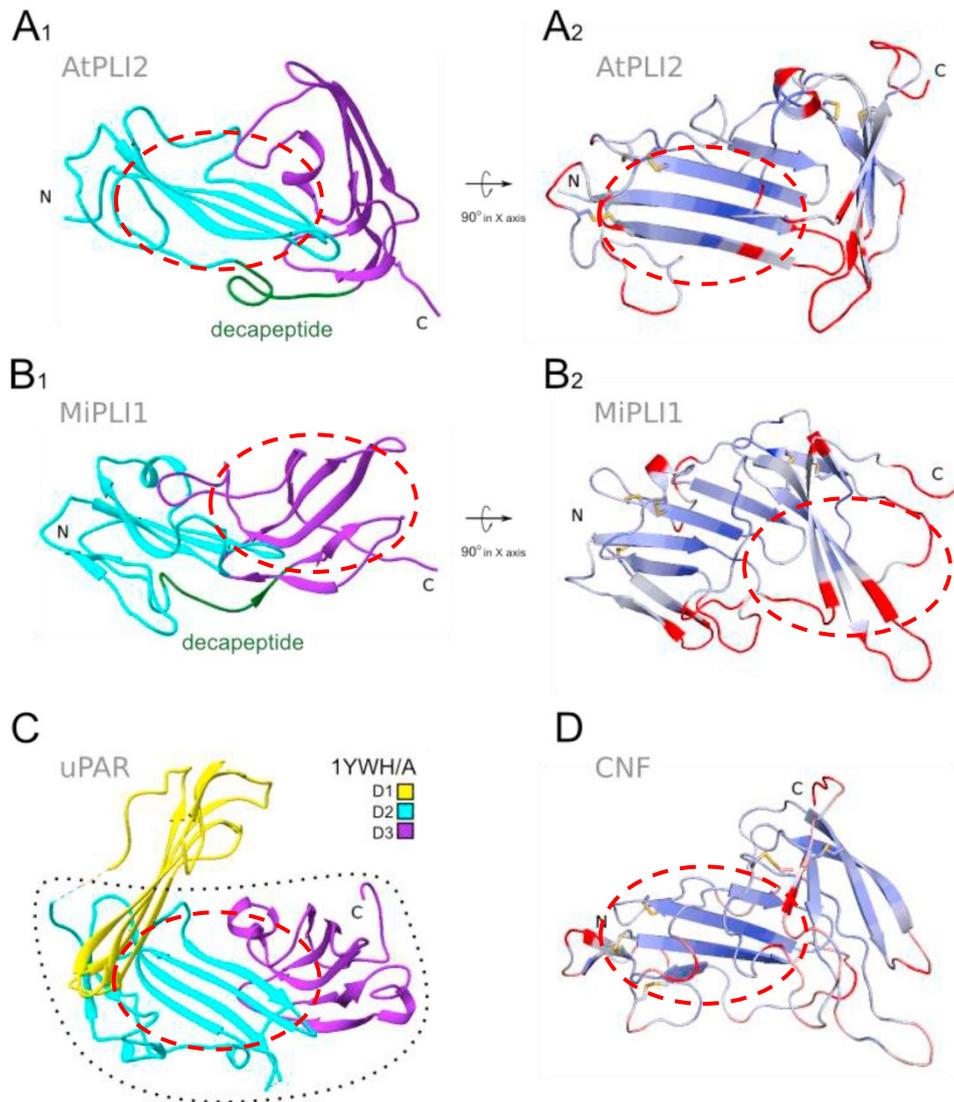


Figura 3: Representação esquemática *in silico* de inibidores de PLA₂ do tipo gama. Em destaque para a formação dos Domínios *Three-fingers* formada por folhas β -pregueadas. FONTE: Picelli e colaboradores (2017).

De forma geral os mecanismos moleculares envolvidos na interação inibidores-PLA₂ dependem da classe a que cada inibidor pertence (Faure, 2000). Alguns estudos estruturais de dicroísmo circular (CD) demonstraram que não há alteração conformacional dos inibidores do tipo α e γ após a formação do complexo com PLA₂ (inibidor-enzima) (Oliveira *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011; Gimenes *et al.*, 2014). Os mecanismos moleculares envolvidos na interação γ PLI/PLA₂s foram primeiramente elucidados a partir de experimentos contra neurotoxinas presente em peçonhas de

serpentes (Ovadia e Kochva, 1977). Estes autores demonstraram pela primeira vez um provável mecanismo de inibição na formação de um complexo não covalente toxina-inibidor. Perales e colaboradores (1995) também demonstraram que inibidores do tipo γ (CNF e CICS) purificados a partir do plasma de *Crotalus durissus terrificus* foram capazes de neutralizar o efeito tóxico da crotoxina (Fortes-Dias, 1991; Perales *et al.*, 1995). O inibidor CICS foi capaz de suprimir a atividade da crotoxina e sua toxicidade em ensaios *in vivo* (Fortes-Dias, 1991; Fortes-Dias *et al.*, 1994; Fortes-Dias, 1999). Ensaios de Ressonância Plasmônica de Superfície demonstraram que o inibidor CICS é capaz de formar complexos monoméricos e multiméricos com β -Neurotoxinas encontradas nas peçonhas das serpentes *Crotalus scutellatus*, *Crotalus durissus terrificus* e *Pseudocerastes fieldi*. Este estudo demonstrou ainda que o inibidor CICS não é capaz de interagir com as subunidades não catalíticas das PLA₂ β -Neurotoxinas. Além disso, a ligação com o inibidor induz a dissociação do heterocomplexo formado pelas subunidades catalíticas e não catalíticas das PLA₂ β -Neurotoxinas (Faure, 2000).

Nos últimos anos pesquisas voltadas para o desenvolvimento de moléculas capazes de inibir especificamente a ação de PLA₂ em células tumorais têm demonstrando o potencial antitumoral de inibidores sintéticos e naturais de PLA₂s (Wang e Dubois, 2007; Donnini *et al.*, 2011; Pucer *et al.*, 2013). A *Bristol-Meyers Squibb* nos últimos anos investiu no desenvolvimento de diversos componentes sintéticos com potencial antitumoral por inibir a ação de PLA₂ endógena, como os compostos BMS-229724 e AACOCF₃, ambos derivados de compostos cetônicos (Sisci *et al.*, 2010). *Isoliquiritigenin*, um flavonoide inibidor de PLA₂s, purificado de *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae) (Li *et al.*, 2013; Hsia *et al.*, 2015) induziu apoptose em células de câncer de mama (MDA-MB-231) por regular negativamente algumas enzimas chaves no metabolismo do AA (Peng *et al.*, 2015).

Inibidores de PLA₂ presentes no soro de animais (Loureiro e D'amore, 2005; Gimenes *et al.*, 2014; Zippel *et al.*, 2016) consistem em novos modelos farmacológicos para a terapia do câncer. Donnini e colaboradores (2011) apresentaram até o momento o único relato publicado de ação antitumoral de um inibidor de PLA₂ purificado do soro da serpente *Python sebae*, uma serpente não peçonhenta. Neste trabalho eles demonstraram o efeito citotóxico e anti-proliferativo de um inibidor de PLA₂ do tipo γ sobre diferentes linhagens de células tumorais, além disso, demonstraram uma redução do crescimento tumoral em modelos *in vivo* utilizando camundongos *nude* transplantados com células tumorais A431.

Gimenes e colaboradores (2014) isolaram e caracterizaram estruturalmente e funcionalmente um inibidor tipo gama (γ CdcPLI) do soro da serpente *Crotalus durissus collilineatus* demonstrando sua capacidade de inibir a atividade catalítica e citotóxica de PLA₂s isoladas de peçonha de serpentes. Uma vez que PLA₂s estão envolvidas em vários eventos moleculares importantes para a sobrevivência, progressão e metástase tumoral, investigamos pela primeira vez o potencial antitumoral, antimetastático e antiangiogênico do inibidor γ CdcPLI.

2.0 Objetivo

Demonstrar a ação antitumoral, antimetastática e antiangiogênica do inibidor γ CdcPLI isolado do soro da serpente *Crotalus durissus collilineatus* sobre células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231).

2.1 Objetivos específicos

- Isolar e sequenciar o γ CdcPLI a partir do soro da serpente *Crotalus durissus collilineatus*.
- Avaliar a citotoxicidade do γ CdcPLI sobre diferentes linhagens de células tumorais (próstata, pulmão, cérvix, intestino e mama) pelo método de MTT.
- Avaliar a indução de morte celular por Anexina V / Iodeto de Propídeo e a expressão de genes e proteínas envolvidos na via de apoptose em células de mama MDA-MB-231.
- Verificar a atividade antimetastática por meio de ensaios de adesão, invasão e migração em células MDA-MB-231; bem como a expressão de genes e proteínas envolvidos nas vias de sinalização de metástase tumoral pelas técnicas de PCR em tempo real, citometria de fluxo e *western blotting*.
- Avaliar a inibição da viabilidade, adesão e migração em células HUVECs e expressão de genes e proteínas envolvidos nas vias de sinalização da angiogênese pelas técnicas de PCR em tempo real e citometria de Fluxo.
- Analisar a atividade antiangiogênica pela quantificação dos níveis de VEGF, inibição da formação de vasos por ensaio em Matrigel (*in vitro*) e por ensaio de anel de aorta (*ex vivo*).
- Quantificar os níveis de Prostaglandina E2 (PGE2) e Leucotrieno B4 (LTB4) nas células MDA-MB-231.

- Analisar a expressão de genes e proteínas envolvidos na via PI3K/AKT em células de mama MDA-MB-231.
- Avaliar a capacidade neutralizadora da atividade pró-inflamatória *in vitro* e *in vivo* de uma PLA₂ (BnSP-7) obtida da peçonha de *B. pauloensis*.

3.0 Materiais e Métodos

3.1. Animais

Camundongos machos da linhagem Balb-c (20-30 g) foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Uberlândia mantidos em condições padrões de temperatura 25°C, umidade relativa do ar de 60-65%, ciclo de 12 horas de luz/noite, dieta e água ad libitum. Os procedimentos realizados com animais apresentam aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA, número do protocolo 042/11) da Universidade Federal de Uberlândia e está em acordo com os princípios éticos de experimentação animal aprovados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 Purificação do inibidor γ CdcPLI

3.2.1 Obtenção do soro de *Crotalus durissus collilineatus*

Durante toda a condução deste trabalho o grupo com cinco (05) espécimes da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (*C. d. collilineatus*) foi mantido no Setor de Manutenção de Répteis, sob a coordenação da Profa. Dra. Vera Lúcia de Campos Brites (Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia). O Setor de Répteis é registrado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais

Renováveis (IBAMA) desde 1995, sendo enquadrado na categoria de Criadouro Conservacionista da Fauna Silvestre – Finalidade Científica.

As coletas de sangue das serpentes seguiam uma periodicidade de acordo com a demanda, respeitando o intervalo de segurança para os animais de no mínimo 30 dias. Estas coletas foram realizadas pelos veterinários responsáveis, Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos (Coordenador Técnico do Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) da Universidade Federal de Uberlândia) e a MSc. Thaís Carneiro Santos Rodrigues, doutoranda da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Em cada coleta, o sangue de *C. d. collilineatus* foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos a 4°C, separado o soro, este foi armazenado a -20°C para purificação do inibidor.

Este trabalho possui registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para acesso ao patrimônio genético sob o número 010632/2014-0. Além de aprovação pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob o número 042/14.

3.2.2 Isolamento do inibidor de PLA₂ γ CdcPLI

O inibidor γ CdcPLI foi purificado utilizando dois passos cromatográficos, como descrito previamente por Gimenes *et al.* 2014. Cerca de 200mg do soro da serpente *C. d. collilineatus* foram aplicados em uma coluna de troca iônica (Q-Sepharose *fast flow* – GE Healthcare) previamente equilibrada em tampão Fosfato de Sódio 0,05M pH 6,5. A eluição das proteínas foi realizada em um fluxo de 12mL/h a temperatura de 25°C, com o tampão Fosfato de Sódio 0,05M em diferentes concentrações de NaCl (0,2M, 0,35M e 0,7M). As frações obtidas (Q1 a Q5) foram monitoradas em espectrofotômetro

Ultrospec 1000 UV/Visível (Pharmacia Biotech) em comprimento de onda de 280nm. Estas frações foram liofilizadas e armazenadas à -20°C.

Após esta primeira etapa a fração contendo o inibidor, denominada Q4, foi aplicada em uma coluna de afinidade NHS Hitrap (N-hydroxysuccinimide) imobilizada com uma PLA₂ obtida da peçonha de *Bothrops pauloensis* (BnSP-7) (Rodrigues, et al., 1998 e Soares et al., 2000). A montagem da coluna NHS-BnSP-7 seguiu as recomendações do fabricante. Posteriormente, esta coluna foi acoplada em um sistema AKTA PRIME GE-HealthCare inicialmente equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM/L pH 7,5. A eluição do inibidor γ CdcPLI foi realizada com 100% do tampão Glicina 100mM/L pH 2,5, em seguida o pH das frações contendo o inibidor foi reestabelecido com um tampão de neutralização Tris-HCl 1M pH 8,0.

3.2.3 Dosagem Proteica

O soro total, as frações obtidas nas cromatografias e o inibidor foram quantificados utilizando-se o método estabelecido por Bradford (1976) (Bradford, 1976) e pelo equipamento BioDrop (Analítica). Brevemente, para o método de Bradford foi construída uma curva padrão de Soroalbumina bovina (1mg/mL) e as concentrações das proteínas foram realizadas em triplicata e a absorbância lida a 595nm ((Multiskan GO ThermoScientific, EUA). A concentração das frações, bem como do inibidor foram determinadas em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a partir de cálculos de regressão linear baseados em valores obtidos na curva padrão utilizando a soroalbumina bovina como proteína padrão, somente admitindo valores para $r^2 > 0,98$.

3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)

A homogeneidade das amostras contendo o inibidor γ CdcPLI foi avaliada em gel de poliacrilamida a 12% (m/v) em condições redutoras na presença de SDS e β -mercaptoetanol, como descrito por Laemmli (1970) (Laemmli, 1970). Brevemente, o sistema de SDS-PAGE descontínuo foi construído com um gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% (m/v) e um gel de separação a 12% contendo Tris-HCl 2,0M (pH 8,8) e SDS a 0,1% (m/v), mantendo a proporção de 0,8:30 de bis:acrilamida. Todos os géis foram preparados em sistema de eletroforese *Hoefler SE 260 Mighty Small II*. As amostras foram preparadas em um tampão de Tris-HCl 0,06M pH 6,8, SDS 2% (m/v), β -mercaptoetanol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,005% (m/v) e glicerol 10% (v/v). Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5min e aplicadas no gel para corrida contendo tampão Tris 0,025M, Glicina 0,192M e SDS 0,1% (m/v) (pH 8,3). Ao final o gel foi corado em uma solução de Coomassie Blue-R250 0,1% (m/v) em água, ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v) e descorado em solução de ácido acético 7% (v/v) e etanol 30% (v/v). O padrão de massa molecular utilizado era composto da mistura das seguintes proteínas: Albumina Bovina 66 kDa; Ovoalbumina 45 kDa; Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 36 kDa; Anidrase carbônica 29 kDa; Tripsinogênio 24 kDa; Inibidor de tripsina 20,1 kDa; α -lactoalbumina; 14,2 kDa.

3.2.5 Inibição da atividade fosfolipásica A₂ pelo γ CdcPLI

A atividade do inibidor foi avaliada pré-incubando o γ CdcPLI com uma PLA₂ ácida enzimaticamente ativa purificada da peçonha de *Bothrops pauloensis* (BpPLA₂-TXI) (Ferreira *et al.*, 2013). Inicialmente, 5 μ g da PLA₂ BpPLA₂-TXI e 10 μ g do inibidor

γ CdcPLI (1:2 m/m) foram previamente incubados por 30 minutos a 37°C, em seguida a atividade PLA₂ foi quantificada por titulação potenciométrica (De Haas *et al.*, 1968). Brevemente, foi preparado o substrato o qual continha uma emulsão de gema de ovo na presença de deoxicolato de sódio 0,03M e CaCl₂ 0,6M. Nesta emulsão os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com uma solução padrão de NaOH 0,1M em pH 8,0 em temperatura ambiente. A atividade fosfolipásica A₂ foi expressa em microequivalentes de base consumida por minuto por μ g de PLA₂ (μ Eq de NaOH/min/mg).

3.2.6 Sequenciamento completo do inibidor γ CdcPLI por espectrometria de massas

O sequenciamento completo do inibidor γ CdcPLI foi realizado utilizando um espectrômetro de massas do tipo *Quadrupole-Time of Flight* com ionização por *electrospray* (QToF Ultima Global, Waters, Milford, MA). Primeiramente foi confirmada a massa real dos monômeros que compõem o inibidor γ CdcPLI, ainda com a proteína íntegra. Após, cerca de 50 μ g do inibidor foram fragmentados utilizando o kit *ProteoExtract Digestion kit* (Calbiochem, Gibbstown, NJ), contendo as seguintes enzimas: *Trypsin*, *Chymotrypsin*, *Glu-C* e *Trypsin/Glu-C*. Os peptídeos obtidos desta fragmentação foram então submetidos ao sequenciamento no espectrômetro de massas, sendo possível a obtenção dos parentais de cada fragmento, bem como o perfil de fragmentação de cada um deles. Os dados obtidos foram então analisados pelo *Software ProteinLynx Global Server* versão 2.2.5 (Waters, Milford, MA). Esta sequência foi utilizada para as análises de alinhamento com diferentes inibidores de PLA₂ do tipo γ , sendo utilizadas as *Web Tools*, *ClustalW* – MUSCLE e BLASTp.

3.3 Avaliação do efeito antitumoral, antimetastático e antiangiogênico do γ CdcPLI

3.3.1 Cultura de células

As linhagens de células humanas tumorais: de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), de próstata (PC3), de pulmão (A549), de Cérvix (HeLa), e as células humanas não tumorais: de mama (MCF 10A) e endotelial (HUVEC - *Umbilical Vein/Vascular Endothelium Cell*) foram obtidas do banco de células da *American Type Culture Collection* (ATCC). As células macrófagos, *Murine peritoneal adherents cells* (MPACs) foram coletadas do exudato peritoneal de camundongos Balb/c, como descrito por Clissa e colaboradores, 2001. A linhagem de célula endotelial murina de timo (t-End - *Timo Endothelial cells*) foram estabelecidas de acordo com Bussolino e colaboradores, 1991 (Bussolino *et al.*, 1991) e gentilmente cedidas pela Dra. Patrícia Clissa do Instituto Butantan – SP. As células foram mantidas em temperatura controlada de 37°C em uma incubadora umidificada contendo 5% de CO₂.

As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio IMDM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100U/mL de Penicilina e 100mg/mL de Estreptomicina. As células MCF 10A foram mantidas em meio DMEN-F12 suplementado com 10% de SFB, 100 μ g/mL de Fator de Crescimento Epidermal (EGF), 1mg/mL de Hidrocortisona, 10mg/mL de Insulina, 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de Estreptomicina. As linhagens de células PC3, A549, HeLa, HUVECs, t-End e macrófagos peritoneais murinos foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 2mM de L-glutamina, 2mM de piruvato de sódio, 1mM de aminoácidos não essenciais, 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina.

3.3.2 Ensaio de citotoxicidade por MTT

As células MDA-MB-231, MCF-7, PC3, A549, MCF 10A e HUVEC foram plaqueadas em placas de 96 poços na proporção de 3×10^4 células/poço. Estas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para melhor adesão à placa. Após 24 horas, foi adicionado um novo meio contendo concentrações decrescentes de γ CdcPLI (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,560; 0,78 e/ou 0,39 μ g/mL) ou apenas meio nos grupos de controle negativo e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Após o tratamento as células foram incubadas com o reagente de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (5mg/mL, 20 μ L/poço) por 3 horas a 37°C. Então foram adicionados 100 μ l de PBS contendo 10% de SDS e 0,01M de HCl em cada poço para a completa dissolução dos cristais de Formazan formados a partir do consumo do MTT pelas enzimas mitocondriais. Após 18 horas a absorbância foi lida a 570nm em espectrofotômetro (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer – Thermo Scientific, USA). O valor de IC₅₀, ou seja, aquela concentração capaz de reduzir a viabilidade das células em 50% foi calculada a partir da curva logarítmica obtida com a curva de concentração-resposta.

3.3.3 Ensaio de Apoptose com Anexina V / Iodeto de Propídeo

O ensaio para a avaliação da apoptose foi realizado com um Kit de Apoptose (BD Biosciences) seguindo as orientações dos fabricantes. Brevemente, as células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 24 poços na quantidade de 2×10^6 células/poço. Após 24 horas para adesão das células, estas foram tratadas com γ CdcPLI (50 e 25 μ g/mL) e meio IMDM no grupo de controle negativo por mais 24 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

Decorrido o tempo de tratamento as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS 1X gelado, ressuspensas em tampão de ligação e contadas em câmara de Neubauer. As células foram divididas em 4 grupos, nos quais continham apenas células sem marcação; células coradas com 2µl de FITC-Anexina V; células coradas com 2µl de PI-Iodeto de Propídeo e células com a dupla marcação coradas com FITC-Anexina V e PI-Iodeto de Propídeo. Estas foram incubadas no escuro por 15 minutos e as análises foram realizadas com auxílio do Software FlowJo - BD Accuri C6 (Biosciences, CA, USA).

3.3.4 Expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)

Células MDA-MB-231 (5×10^6) foram plaqueadas em garrafas de 25cm² e tratadas por 24 horas com γ CdcPLI em uma concentração de 25µg/mL, mantidas em estufa contendo 5% de CO₂. As células HUVEC (5×10^6) foram tratadas em suspensão por 1 hora com γ CdcPLI (25µg/mL), também mantidas em estufa contendo 5% de CO₂. O grupo controle foi tratado apenas com meio IMDM, para células MDA-MB-231 e RPMI 1640, para células HUVEC.

Após o tratamento, o RNA foi extraído utilizando o Kit Tri-Reagent Sigma®. Brevemente, 1mL de Trizol para uma quantidade de $5-10 \times 10^6$ células e 200µL de Clorofórmio foram adicionados em cada microtubo contendo as células, agitados vigorosamente por 15 segundos e centrifugados a 13.000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, foi adicionado 500µL de Isopropanol e centrifugado novamente a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1mL de Etanol 75%, sendo novamente centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação o RNA foi ressuspensão com água *RNAse free* e dosado no BioDrop (BioDrop – Inglaterra). O

cálculo da pureza do material foi realizado de acordo com os valores de absorvância a 280 e 260nm, sendo admitida pureza do RNA para valores acima de 1,7.

O cDNA foi construído a partir do RNA extraído utilizando o Kit GoScript Reverse Transcription System (Promega[®]), seguindo as orientações do fabricante. Em que indicam para cada reação utilizar 2µg de RNA. Dessa forma, primeiramente preparou-se um Mix 1 contendo RNA e primer, que foi incubado por 5 minutos a 70°C e 5 minutos no gelo. Em seguida, foi preparado o Mix 2 contendo Tampão, MgCl₂, RNAsin, mix para PCR e a Enzima Transcriptase Reversa, esta mistura 2 foi incubada por 5 minutos a 25°C e 60 minutos a 42°C. O cDNA foi mantido em -20°C.

A modulação da expressão gênica foi analisada por PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR). Estas análises foram realizadas utilizando-se uma biblioteca de primer comercial contendo diferentes genes envolvidos com processos celulares (Human Cancer Pathway Primer Library - GO-GenOne; Brazil; <http://www.genone.com.br>). O PCR quantitativo foi realizado em triplicata utilizando o Kit Master Mix–Sybr Green (LGC Biotechnology; Brazil) de acordo com o fabricante. Brevemente, foram adicionados ao kit de reação 2µL de cDNA e 0,1µM de cada primer, os parâmetros determinados para os ciclos seguiram o seguinte padrão: 50 ciclos a 95°C de 10 segundos e 58°C de 45 segundos. Os dados obtidos do RT-PCR foram padronizados de acordo com o método *Comparative Threshold Cycle (CT)*, segundo Livak and Schmittgen, 2001. Os dados foram normalizados utilizando β-actina e GAPDH como controles endógenos da reação e os resultados foram expressos em *Fold Changes* (expressão dos genes do grupo tratado com γCdcPLI comparado com grupo controle, apenas meio de cultura), estes valores foram convertido para a representação gráfica (-1/ΔΔCT).

3.3.5 Western blotting

As células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 6 poços (1×10^6 célula/poço) em triplicata e incubadas *overnight*. Após este tempo, as células foram incubadas com γ CdcPLI (25 μ g/mL) por 24h. Após o tratamento as células foram lavadas com PBS gelado e tratadas com RIPA *lysis buffer* com inibidores de proteases (sc-24948) e centrifugadas a 12.000xg por 10 minutos a 4°C. As alíquotas do sobrenadante foram submetidas a um gel de eletroforese (SDS-PAGE, 10% acrilamida e bis-acrilamida) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences). As membranas foram bloqueadas por 1 hora com TBS-T (150mM cloreto de sódio, 50mM Tris [pH 8] e 0.1% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado e posteriormente foram incubadas com os anticorpos phospho-Akt Ser473 (#4060), phospho-ERK1/2 Thr202/Tyr204 (#9101), ERK1/2 (#9102), phospho-p38 Thr180/Tyr182 (#4511), p38 (#9212), phospho-p53 Ser15 (#9284), p53 (#2524) e phospho-IKK α /IKK β Ser176/Ser177 (#2078S) da empresa *Cell Signaling*; Akt 1/2/3 (sc-8312), PRT (sc-20975), GAPDH (sc-47724), Caspase 3 (sc-7148) e Caspase 7 (sc-56063) da empresa Santa Cruz Biotechnology; phospho-I κ B α Ser32/Ser36 (NB-100-56724) e I κ B α (NB-120-22071) da empresa Imgenex. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-rabbit secundário anti-IgG ((#474 1506) ou anti-mouse (#04 18 06) conjugado com peroxidase da empresa KPL, os sinais foram visualizados com quimioluminescentes usando o substrato *SuperSignal chemiluminescent substrate* (Life Technologies). Sendo que, todas as imagens foram obtidas usando o sistema Uvitec Alliance.

3.3.6 Ensaio de adesão celular

As células MDA-MB-231 e HUVEC (3×10^4 células/poço) foram pré-incubadas com diferentes concentrações do inibidor (50; 25; 12,5; 10; 6,25; 5; 3,125 e 2,5 μ g/mL) por 30min a 37°C. Após a incubação as células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 2 horas a 37°C em estufa de CO₂. As células que não aderiram foram removidas com PBS 1X e as células aderidas foram mensuradas pelo método de MTT, como descrito no item como descrito no item 3.2.2.

Para o ensaio de adesão, células HUVEC foram pré-tratadas em diferentes concentrações de γ CdcPLI (50, 25, 10, 5 e 2,5 μ g/mL) por 30 minutos a 37°C e semeadas em diferentes componentes da matriz extracelular, como Colágeno IV (10 mg/mL em 0.1 M de Ácido Acético), Fibronectina (10 mg/mL em PBS), ou Matrigel (10 mg/mL em PBS). Células cultivadas em placas sem nenhum componente da matriz extracelular foram utilizadas como controle. Após a pré-incubação as células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 2 horas a 37°C em estufa de CO₂. As células que não aderiram foram removidas com PBS 1X e as células aderidas foram mensuradas pelo método de MTT, como descrito no item 3.2.2.

3.3.7 Ensaio de migração por *Wound healing*

A inibição da migração das células MDA-MB-231 foi primeiramente analisada pela técnica de *Wound healing* como descrita por Jung (2013) (Jung *et al.*, 2013), com algumas modificações. Brevemente, as células foram semeadas a 4×10^6 células/poço em placas de 12 poços. Após 24 horas foi realizado um corte na monocamada das células com o auxílio de uma ponteira de 10 μ L, o meio foi descartado e trocado por um novo meio contendo ou não o inibidor γ CdcPLI. As células aderidas foram então tratadas com

o inibidor de PLA₂ (γ CdcPLI) a 25 μ g/mL por 24 horas e a confluência das células foi analisada em um microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS100) e fotografada em câmera Nikon TS1000 (na magnitude de 10X).

3.3.8 Ensaio de migração e invasão em *Transwell*

Os ensaios de migração e invasão celular foram realizadas utilizando um inserto de cultura celular com poro de 8 μ m (Greiner Bio-One, Suíça). Neste ensaio as células MDA-MB-231 e HUVEC foram pré-incubadas em meio IMDM e RPMI sem Soro Fetal Bovino contendo diferentes concentrações de γ CdcPLI (50 e 25 μ g/mL) por 30 minutos a 37°C. Após esta incubação, as células (1x10⁵célula/transwell) foram semeadas na parte superior da câmara dos insertos e no compartimento inferior foi adicionado meio com 10% de SFB como quimioatrativo para as células.

No ensaio de invasão celular, os insertos de cultura celular foram previamente revestido com Matrigel (Corning® Matrigel® Matrix, USA) diluído na razão 1:10 (Matrigel:PBS) com meio sem SFB (*overnight*), antes das células serem semeadas. As células foram mantidas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após, as células que não migraram foram retiradas do compartimento superior do inserto com a ajuda de uma haste flexível de algodão, e as células que migraram ou invadiram foram coradas com o Kit Rápido Panótico (Laborclin, Brasil) e fotografadas com Nikon Eclipse TS100 após contagem para construção dos gráficos.

3.3.9 Expressão de Integrinas em células HUVECs

A análise de expressão e reconhecimento de integrinas na superfície das células HUVEC foi realizada utilizando-se anticorpos anti-integrina em Citometria de fluxo.

Estas foram pré-incubadas com γ CdcPLI (50 μ g/mL) por 1 hora a 37°C em estufa húmida contendo 5% de CO₂. Após esta pré-incubação, as células (1x10⁵ células/poço) foram lavadas com PBS 1X e incubadas com BSA 0,5% por 20 minutos no gelo para bloqueios inespecíficos, em seguida foram novamente lavadas e ressuspensas em PBS 1X.

As células foram então incubadas com anticorpos humano monoclonal anti- α 2 (CD49b) Fluorescein, humano anti- β 1 (CD29) Fluorescein, humano anti- α V β 3 (CD51/CD61) fluorescein e humano anti- α 5 (CD49e) fluorescein (Ambriex, Brazil), em uma concentração de 2 μ g de anticorpos a cada 10⁶ células em PBS com BSA 1% por 30 minutos a 4°C. Células em suspensão foram incubadas com os respectivos Anticorpos monoclonais Isotipos (Isotipo FITC e Isotipo PE) e após a incubação as amostras foram lavadas, ressuspensas em PBS 1X e analisadas com auxílio do software da BD Accuri C6 Flowjo (BD Accuri C6 - Biosciences, CA, USA).

3.3.10 Angiogênese *in vitro*

Para o ensaio de formação de vasos *in vitro*, inicialmente placas foram previamente revestidas com 50 μ l de Matrigel (Corning® Matrigel® Matrix, USA) por 30 minutos. As células HUVEC (5x10⁵ cel/poço) foram pré-incubadas com o inibidor γ CdcPLI (25 μ g/mL e 50 μ g/mL) por 30 minutos a 37°C em meio RPMI suplementado com bFGF (10ng/mL). Em seguida, as células foram semeadas nos poços de placas de 24 poços contendo Matrigel. Estas foram mantidas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ por 18 horas, antes de ser analisada a formação dos vasos e fotografados em um microscópio invertido em uma magnitude de 10X (Nikon Eclipse TS100).

3.3.11 Dosagem de VEGF no sobrenadante de células HUVEC

Os níveis de VEGF foram quantificados no sobrenadante das células HUVEC obtidos após o ensaio da formação de vasos *in vitro*. Esta dosagem foi realizada utilizando um Kit CBA para proteínas celulares (BD – EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, uma curva padrão foi construída com diferentes concentrações de VEGF conhecidas (2500, 1250, 625, 312,5, 156, 80, 40, 20 e 10pg), posteriormente adicionou-se 25µl do Mix de *Beads* (*Diluent Beads* e *Capture Beads*). Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e em seguida adicionados 25µL do *Mix PE Detection Reagent*, sendo então incubado por mais 2 horas em temperatura ambiente. Após esta incubação as amostras foram lavadas com 500µL de *Wash Buffer* e centrifugadas a 200 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi então retirado e o *pellet* de células ressuspensionado em 300 µL de *Wash Buffer*. As amostras foram submetidas ao Citômetro de fluxo e analisadas com o auxílio do *software Flowjo* BD Accuri C6 (BD Accuri C6 – Biosciences, CA, USA).

3.3.12 Ensaio de anel aórtico – modelo de angiogênese *ex vivo*

O ensaio para avaliar a angiogênese em modelo *ex vivo* foi realizado de acordo com Abu, et al., 2016 com algumas adaptações. Para isto, os fragmentos aórticos (1 – 1,5 mm) foram removidos de camundongos Balb-c machos (6 semanas – aproximadamente 30gr) e colocados em PBS gelado suplementado com penicilina-estreptomicina 1%.

Os fragmentos foram colocados na camada de Matrigel em placas de 48 poços e incubados em meio RPMI suplementado com bFGF (10ng/mL) e EGF (20ng/mL) por 24 horas antes de iniciar o tratamento com γ CdcPLI (25 e 50µg/mL). Após estas 24

horas os fragmentos foram tratados durante 7 dias, com intervalos de tratamento de 2 dias. Ao final deste período, os fragmentos dos anéis aórticos foram analisados para avaliar os brotamentos celulares formados a partir dos fragmentos aórticos e fotografados utilizando um microscópio ótico invertido na magnitude de 10X (Nikon Eclipse TS100).

3.3.13 Dosagem de prostaglandina E2 e leucotrieno B4 no sobrenadante de células após tratamento com o γ CdcPLI

Os níveis de Prostaglandina E2 (PGE2) e Leucotrieno B4 (LTB4) nos sobrenadantes das células humanas MD-MB-231 e murinas (t-End e MPAC) foram avaliados com o uso do kit comercial de imunoenensaio enzimático (EIA Kit – Cayman; USA), de acordo com o protocolo dos fabricantes. Células MD-MB-231 (4×10^6 célula/poço) foram plaqueadas em placas de 12 poços, após este tempo o meio foi retirado e adicionado um meio novo contendo γ CdcPLI (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Após esse período o sobrenadante foi coletado para a dosagem de PE2 e LTB4.

A dosagem de PGE2 no sobrenadante das células murinas t-End e MPAC (1×10^5 célula/poço) ocorreu após estímulo das mesmas com uma PLA₂ pró-inflamatória (BnSP-7) isolada da peçonha de *B. pauloensis* (Soares *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2009). Para este ensaio foram utilizados os seguintes grupos; controle negativo (células tratadas apenas com meio de cultura), controle positivo (células tratadas com BnSP-7 na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$), tratado com a BnSP-7 pré incubada por 30 minutos com o inibidor γ CdcPLI na proporção de 1:0,5 (m/m) (5 $\mu\text{g/mL}$ de BnSP-7 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de γ CdcPLI). Os sobrenadantes obtidos após os tratamentos foram utilizados para dosagem de PGE2.

Os níveis de PGE2 e LTB4 no sobrenadante das células foram obtidos após a construção de uma curva padrão com as concentrações de PGE2 e LTB4 conhecidas (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6 e 7,8 pg/mL). A reação foi realizada adicionando 50µL dos sobrenadantes em cada poço da placa de 96 poços e 50µL de Prostaglandina E2 ou Leucotrieno B4 “*Ache Tracer*”; e 50µL de Anticorpos Monoclonais Prostaglandina E2 ou Leucotrieno B4. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C e para sua revelação sendo em seguida lavada 5 vezes com *Wash Buffer* e foram adicionados 200µL de *Ellman's Reagent* em cada poço. Após este procedimento a placa foi incubada por 65 minutos e sua leitura em 420nm foi realizada em espectrofotômetro ((Multiskan GO ThermoScientific - EUA).

3.3.14 Dosagem de citocinas em células murinas (t-End e MPAC) estimuladas por uma PLA₂ básica (BnSP-7)

Os sobrenadantes obtidos das células t-End e Macrófago (MPAC), como descritos no item anterior (3.2.13) foram utilizados para quantificação da concentração de Citocinas pró-inflamatórias utilizando o Kit de Inflamação CBA (BD- Biosciences) seguindo as instruções dos fabricantes. Brevemente, para a quantificação foram usados 50µl do sobrenadante e/ou diferentes concentrações de proteína da curva padrão (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6 e 7,8 pg/mL) e adicionadas a uma mistura de *beads* de diferentes citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-12p70) conjugadas com PE para detecção em Citometria de Fluxo. Após 3 horas de incubação os *beads* de captura foram lavados, para retirada de excesso de *beads* não desejados, e analisados em um Citômetro BD Accuri C6 (BD Accuri C6 - Biosciences, CA, USA).

3.3.15 Atividade edematogênica em pata de camundongos Balb-c

A formação de edema foi induzida com a PLA₂ BnSP-7, seguindo a metodologia descrita por Landucci e colaboradores (1995) (Landucci *et al.*, 1995). Inicialmente as amostras foram preparadas em um volume de 25µL para cada grupo experimental: **Grupo 1-** PBS; **Grupo 2** – PLA₂ BnSP-7 (5µg); **Grupo 3** – γCdcPLI (2,5µg); **Grupo 4-** Pré-incubação da PLA₂ BnSP-7 com o inibidor γCdcPLI na proporção de 1:0,5 (5µg de BnSP-7 para 2,5µg de γCdcPLI, m/m) por 30 minutos a 37°C. Em seguida, todas as amostras foram injetadas por via subcutânea na pata direita de camundongos Balb-c (n=3). O volume das patas foi avaliado nos tempos 0, 30min, 1h, 3h, 6h e 24h com o auxílio de um paquímetro eletrônico.

3.4 Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os resultados expressos em *mean* ± *S.E.M.* As diferenças entre os grupos de tratamento e controle foram analisados pelo teste *Student's t-test (Unpaired or Nonparametric test)*, assumindo uma distribuição normal Gaussiana) ou pelo teste *One-Way ANOVA*, e nos casos em que a comparação foi feita com duas ou mais variáveis foi realizado o teste *Two-Way ANOVA*; quando possível foram realizados o pós-teste *Bonferroni post-test*, com o auxílio do *software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)*. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (**) e $p < 0,001$ (***).

4.0 Resultados

4.1.1 Obtenção e sequenciamento do inibidor γ CdcPLI

O fracionamento do soro de *C. d. collilineatus* foi realizado seguindo a metodologia previamente estabelecida por Gimenes, *et al.*, 2014. Como demonstra a **Figura 4A**, após o primeiro passo cromatográfico em resina *Q-Sepharose Fast Flow* a fração Q4 foi submetida à cromatografia de afinidade resultando na obtenção do inibidor γ CdcPLI. Em seguida, sua homogeneidade foi confirmada por SDS-PAGE (**Figura 4B**) e sua atividade pela inibição da atividade fosfolipase A₂ da BpPLA₂-TXI (dados não mostrados).

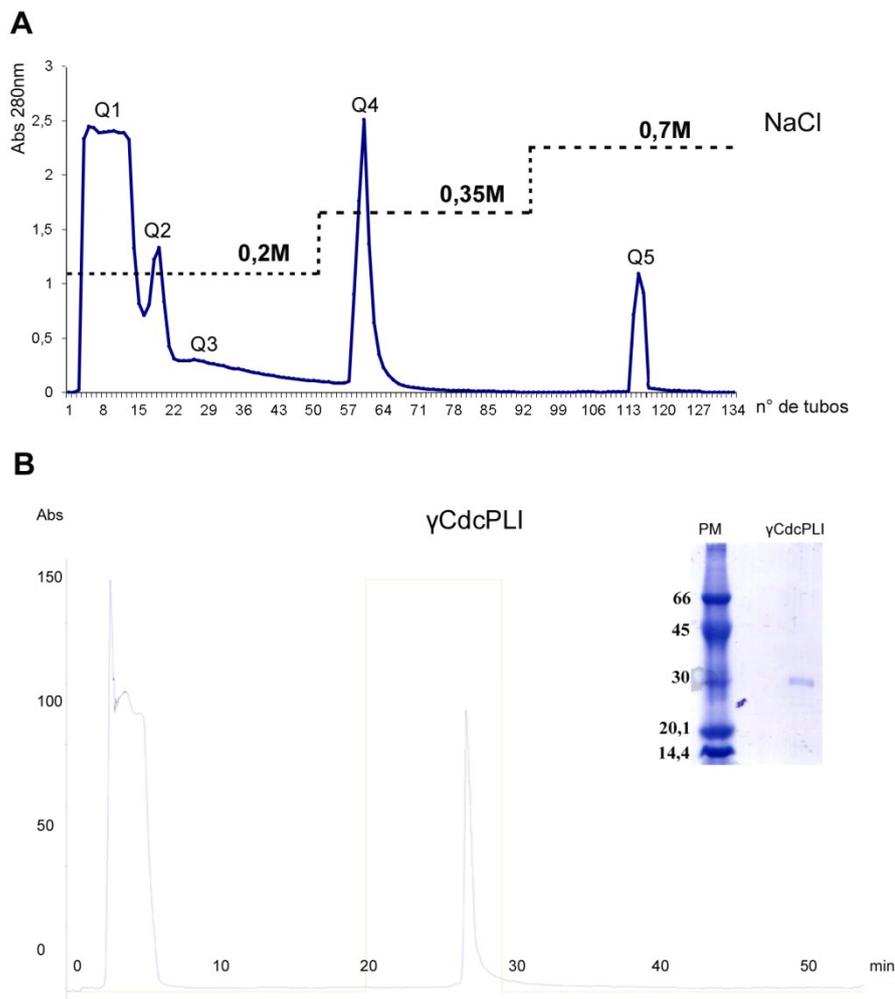


Figura 4: Purificação do inibidor de PLA₂ γ CdcPLI. A) Cromatografia de troca iônica em resina Q-Sepharose *Fast Flow* equilibrada com tampão Fosfato de Sódio (0,05M) e NaCl (0,2M). Eluição com NaCl (0,35M a 0,7M) em um fluxo de 12,0mL/h a 25°C. B) Cromatografia de afinidade em resina NHS-HiTrap (N-hydroxysuccinimide) acoplada com uma PLA₂ básica (BnSP-7) equilibrada com tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,5 e eluída com tampão Glicina-HCl, pH 2,0. C) PAGE-SDS 12,5% com o inibidor γ CdcPLI: Padrão de Peso Molecular: 66.000; 45.000; 30.000; 20.100; 14.400.

4.1.2 Sequenciamento, determinação do sítio de glicosilação e alinhamento

O sequenciamento completo do inibidor γ CdcPLI permitiu identificar os sítios de glicosilação predito, bem como o experimental e além disso confirmar a existência da sequencia de aminoácidos descrita como participante do reconhecimento e inibição de PLA₂ (Figura 5). A partir do sequenciamento completo foi possível perceber uma

alta identidade com outros inibidores de PLA₂, uma vez que esta classe de proteínas possuem domínios conservados (**Figura 6**).

Peptídeo Sinal
-----SCDFCHNIGKDCDGYEEECSSPEDVCGKVLLEISSASLSVRTVHKNCFSSICKLGQFDVNI
GHHSYIRGRINCCEKELCEDQPEPGEPLSKPNGYYCPGAIGLFTKDSTEYEAICKGTETKINIVGHRYEQFPG
DISYNLKGCVSSCPLLSLSNATFEQNRNYLEKVECKDAIRLASL

Figura 5: Sequência completa de aminoácidos do inibidor de PLA₂ γ CdcPLI obtida por Espectrometria de massas (*Macro Mass Global Ultima Q-TOF – Quadrupole Time of Flight*). Verde Escuro: Sítio de glicosilação experimental (O-glicosilado); Verde Claro: Sítio de glicosilação predito. Vermelho: Região do Heptapeptídeo descrito como responsável pelo reconhecimento e inibição de PLA₂.



Figura 6: Alinhamento das sequências de aminoácidos de inibidores do tipo γ . O alinhamento foi feito utilizando *Web Tools* BLASTp e ClustalW (MUSCLE). (*) indica resíduo de aminoácido conservado; (:) indica que houve uma modificação de aminoácido com mesmas características; (.) indica modificação de aminoácido de grupo diferente; Vermelho representa os resíduos de aminoácidos diferentes nas sequências alinhadas. γ CdcPLI (*Crotalus durissus collilineatus*), Q90358.1 = CNF de *Crotalus durissus terrificus*, P60591.1 = LNF 1 e P60592.1 = LNF 2 de *Lachesis muta* e ABV91326.1 = γ BjussMIP de *Bothrops jararacussu*.

4.2 Inibição da liberação de PGE2 por células murinas pela ação do γ CdcPLI

O γ CdcPLI inibiu a liberação de PGE2 nos sobrenadantes de células endoteliais murinas (t-End) e macrófagos peritoneais murino (MPAC) tratadas com uma PLA₂ pró-inflamatória (BnSP-7). O tratamento das células com a PLA₂ BnSP-7 induziu a liberação de PGE2 em células endoteliais t-End (**Figura 7**). Os níveis de PGE2 no sobrenadante de células (MPAC) tratadas com BnSP7 extrapolaram o limite de detecção (dados não mostrados). Interessantemente, a pré-incubação da PLA₂ com o

inibidor γ CdcPLI por 30 minutos reduziu a liberação de PGE2 em células t-End (**Figura 7**). Além disso, as células t-End quando tratadas apenas com o inibidor não induziram a liberação de PGE2 no sobrenadante das células.

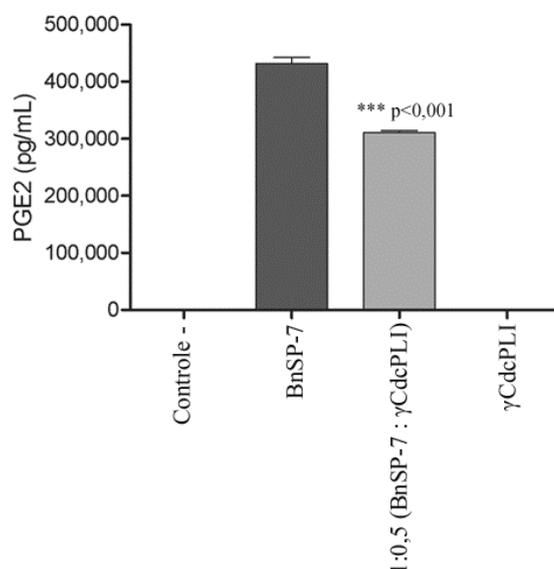


Figura 7: Quantificação de Prostaglandina E2 liberada por células endoteliais murinas (t-End). Nível de PGE2 no sobrenadante de células t-End. **Controle negativo:** Meio de cultura RPMI; **BnSP-7:** Estímulo com a Fosfolipase A₂ pró inflamatória purificada da peçonha de *B. pauloensis*; **1:0,5:** Fosfolipase A₂ BnSP-7 pré-incubada por 30 minutos a 37°C com o inibidor γ CdcPLI na proporção de 1:0,5 (5 μ g/mL de BnSP-7 : 2,5 μ g/mL do inibidor γ CdcPLI); **γ CdcPLI:** células tratadas apenas com o inibidor de PLA₂ (2,5 μ g/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e apresentados como média \pm S.E.M; diferenças comparadas entre os tratamentos e controle foram analisados por *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por ***p<0,001.

4.2.1 Redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias em células murinas (t-End, MPAC) pelo γ CdcPLI

A PLA₂ BnSP-7 aumentou a liberação de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante de células murinas t-End e macrófagos para 2.250pg/mL (IL-6) e 270pg/mL (IL-1 β) em relação ao controle negativo, respectivamente (**Figura 8A**). A PLA₂ BnSP-7 também aumentou a liberação de TNF- α em (MPAC) após 6h do

estímulo para 1.500pg/mL (**Figura 8B**). Após a pré-incubação da BnSP-7 com o inibidor γ CdcPLI na proporção de 1:0,5 (5 μ g/mL de BnSP-7 para 2,5 μ g/mL de inibidor) observou-se uma redução da liberação de IL-6 para 1.500pg/mL, IL-1 β para 30pg/mL e TNF α para 750pg/mL (**Figura 8**). As células tratadas apenas com o inibidor não foram capazes de liberar citocinas pró-inflamatórias.

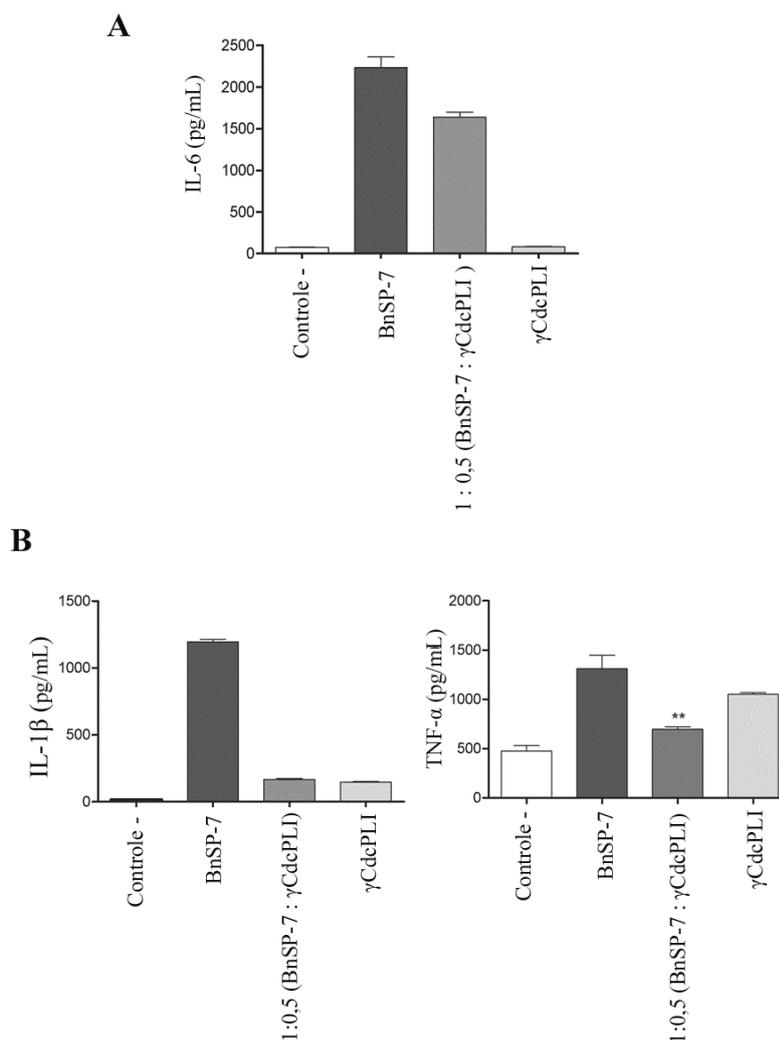


Figura 8: Análise da liberação de citocinas pró-inflamatórias em células t-End e Macrófago Peritoneal de murinos (MPAC). **A)** Liberação de citocina IL-6 no sobrenadante de células endoteliais de murinos (t-End); **B)** Liberação de citocina IL-1 β e TNF- α em macrófagos peritoneais de murinos (MPAC); células estimuladas pela PLA₂ pró-inflamatória BnSP-7 (5 μ g/mL), como controle positivo; pré-incubação por 30 minutos da BnSP-7 com inibidor γ CdcPLI na razão 1:0,5 (5 μ g/mL de BnSP-7 : 2,5 μ g/mL do inibidor γ CdcPLI); controle negativo meio de cultura RPMI e grupo tratado apenas com inibidor (2,5 μ g/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e apresentados como média \pm S.E.M; diferenças comparada entre os tratamentos e controle foram analisados por *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por ** $p < 0,005$.

4.2.2 Inibição da formação de edema em pata de camundongos estimulada pela PLA₂ BnSP-7

A PLA₂ BnSP-7 induziu a formação de edema em pata de camundongos após 30 minutos de injeção, tendo um pico de edema no tempo de 1 hora e redução completa após 24 horas do estímulo. A pré-incubação da PLA₂ BnSP-7 com o inibidor γ CdcPLI na proporção de 1:0,5 (5 μ g de BnSP-7: 2,5 μ de γ CdcPLI - m/m) reduziu significativamente a formação de edema na pata de camundongos para 50% e 38% após 1 e 3 horas, respectivamente. Além disso, o tratamento apenas com o inibidor não induziu formação de edema (**Figura 9**).

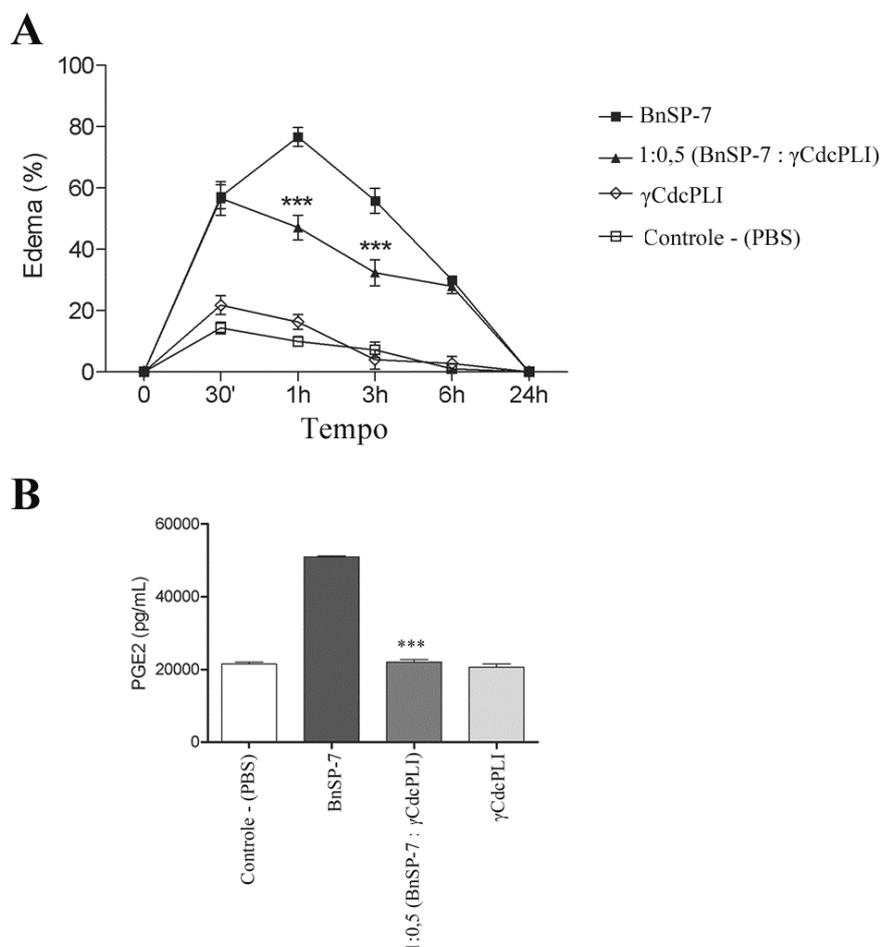


Figura 9: Análise da formação de edema em pata de camundongos e quantificação de Prostaglandina E2 no macerado de pata. A) Formação de edema em pata de camundongos Balb-c induzido pela PLA₂ BnSP-7. **Controle negativo:** PBS; **Controle positivo:** BnSP-7 (5μg); **Grupo Tratado:** BnSP-7: γCdcPLI pré-incubado por 30min. (5μg de BnSP-7 : 2,5μg de inibidor γCdcPLI); grupo tratado com 2,5μg γCdcPLI. **B)** Quantificação de PGE2 no macerado de pata de camundongos Balb-c após 1 hora da inoculação de PLA₂ BnSP-7 (5μg), controle negativo (PBS), γCdcPLI (2,5μg) e pré-incubação da BnSP-7 com inibidor na razão 1:0,5 (5μg de BnSP-7 : 2,5μg de inibidor γCdcPLI - m/m). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os valores apresentados como média ± S.E.M; diferenças comparada entre os tratamentos e controle foram analisados por *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por ***p<0,001.

4.3 Efeito antitumoral do inibidor de PLA₂ γ CdcPLI

4.3.1 Citotoxicidade em células tumorais e não tumoral

O efeito citotóxico do γ CdcPLI foi testado sobre diferentes linhagens de células tumorais e não-tumorais. O inibidor a 50, 25, 12.5, 6,25, 3,125, 1,560, 0,78 e 0,39 μ g/mL reduziu a viabilidade destas células de forma dose-dependente após 24 horas (**Figura 10**). A Tabela 1 apresenta os valores de IC₅₀, a saber: células de câncer de pulmão -A549 (41 μ g/ml), células de câncer de Cérvix-HeLa (38 μ g/ml), 30 μ g/ml para PC3 (células de câncer de Próstata) e para as células de câncer de mama para MCF-7 (28 μ g/ml) e MDA-MB-231 (25 μ g/ml). Não foi possível determinar o IC₅₀ para as células de mama não tumorais (MCF 10A) uma vez que o γ CdcPLI foi pouco citotóxico para esse tipo celular (**Figura 10**). O inibidor foi significativamente mais citotóxico para as células tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) quando comparado com outras linhagens de células tumorais. Visto isso, a linhagem MDA-MB-231 altamente metastática e agressiva foi escolhida para os próximos ensaios de efeito antitumoral e antimetastático do γ CdcPLI.

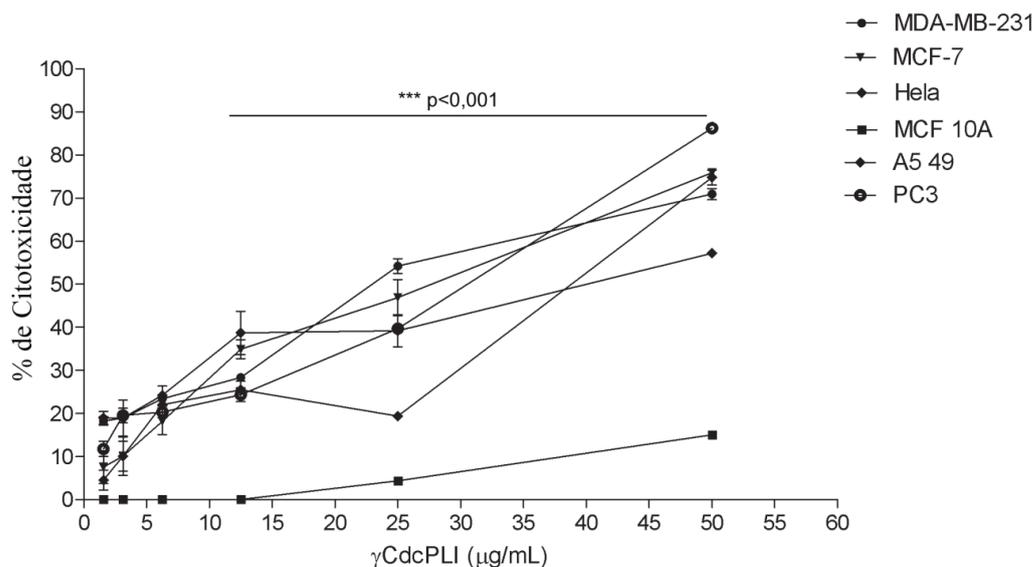


Figura 10: Citotoxicidade induzida pelo γ CdcPLI em diferentes linhagens de células tumorais humanas, avaliada pelo ensaio de MTT. As células A549 (células de câncer de pulmão), HeLa (células de câncer de Cérvix), PC3 (células de câncer de Próstata), MCF-7 e MDA-MB-231 (células de câncer de mama), e MCF 10A (célula de mama não-tumoral) foram tratadas com o inibidor γ CdcPLI (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,560; 0,78 ou 0,39 μ g/mL) por 24 horas. Todos os dados são apresentados como média \pm S.E.M e em triplicas independentes; diferenças entre os dois tipos celulares foram analisados por ANOVA *One-way* e *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos quando *** $p < 0,001$.

Tabela 1: Valores de IC_{50} para diferentes linhagens de células tumorais

Linhagem Celular	valor de IC_{50} ^a (μ g/mL)	Estatística (IC_{50}) ^b
MDA-MB-231	25 \pm 1,72	-----
MCF-7	28 \pm 4,1	Ns
PC3	30 \pm 0,56	***
HeLa	38 \pm 3,4	***
A549	41 \pm 3,72	***

^a Valor de IC_{50} calculado por $\log(x)$ / Ns: Não significativo

^b Valores de IC_{50} comparados com MDA-MB-231 (*** $p < 0.001$)

4.3.2 Apoptose em células tumorais de mama (MDA-MB-231)

O γ CdcPLI induziu apoptose inicial de 47,1% e 34,1% e apoptose tardia de 15,7% e 25,9% após o tratamento das células com 25 μ g/mL e 50 μ g/mL, respectivamente (**p < 0.001 and **p < 0.005). Além disso, foram identificados baixos valores de necrose das células quando tratadas com o γ CdcPLI nestas mesmas concentrações (**Figura 11**).

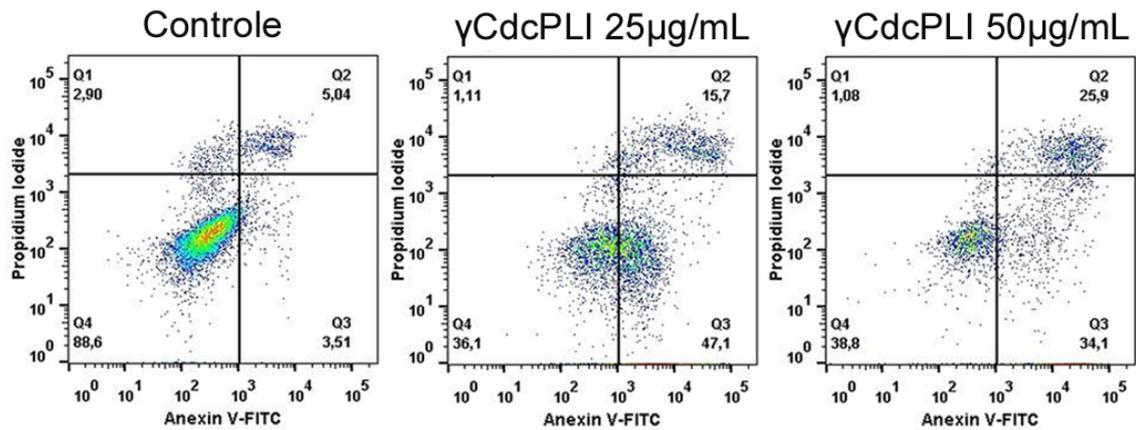
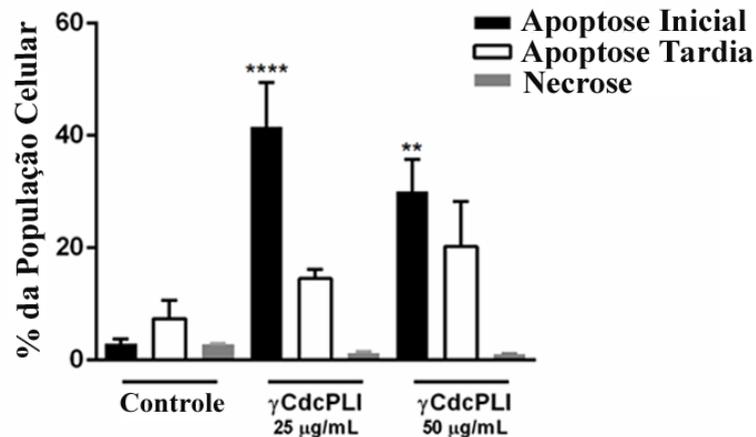
A**B**

Figura 11: Apoptose em células tumorais de mama (MDA-MB-231) após tratamento com o inibidor γ CdcPLI. A) Gráfico representativo por *Dotplot* demonstrando porcentagem de células em apoptose e necrose. B) Análise da apoptose representada por diagrama de barras mostrando as porcentagens de células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Todos os dados são apresentados como média \pm S.E.M e foram feitos em triplicas independentes; diferenças comparada entre os tratamentos e controle foram analisados por ANOVA *One-way*, *Two-way* e *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por * $p < 0,001$ e ** $p < 0,005$.**

4.3.3 Modulação da expressão de genes e proteínas envolvidas na apoptose

O tratamento das células tumorais MDA-MB-231 com o inibidor (25µg/mL) modulou a expressão de diferentes genes da via de sinalização intrínseca (BAD, BAX, BCL2 e BCL2L1) e extrínseca da apoptose (TNF, TNFRS10B, TNFRSF1A e Caspase 8) (**Figura 12A**). Dois genes que codificam receptores de TNF (TNFRS10B e TNFRSF1A) foram regulados positivamente, e todos os outros genes (pró e antiapoptótico) foram regulados negativamente (**p < 0.001).

O γ CdcPLI também modulou a expressão de outros genes relacionados a apoptose. Os genes MDM2 e BIRC5 (Survivina) foram regulados negativamente em contrapartida o gene TP53, responsável por codificar o supressor tumoral p53, foi regulado positivamente, tendo sua expressão aumentada em aproximadamente 600 vezes em comparação com as células controle (**p < 0.001). Corroborando com os resultados de expressão gênica, os níveis de p53 fosforilado, ou seja em sua forma ativa (p-p53), aumentaram nas células de câncer de mama MDA-MB-231 após o tratamento com o inibidor γ CdcPLI (**Figura 12B**). Além disso, foi observado um aumento nos níveis de ERK fosforilado em sua forma ativa (p-ERK) quando comparado com o grupo sem tratamento com o inibidor. Este resultado sugere uma possível ação na via de MAPK-ERK. Por fim, o inibidor não induziu um aumento na expressão das formas ativas das caspases 3 e 7 (**Figura 12B**).

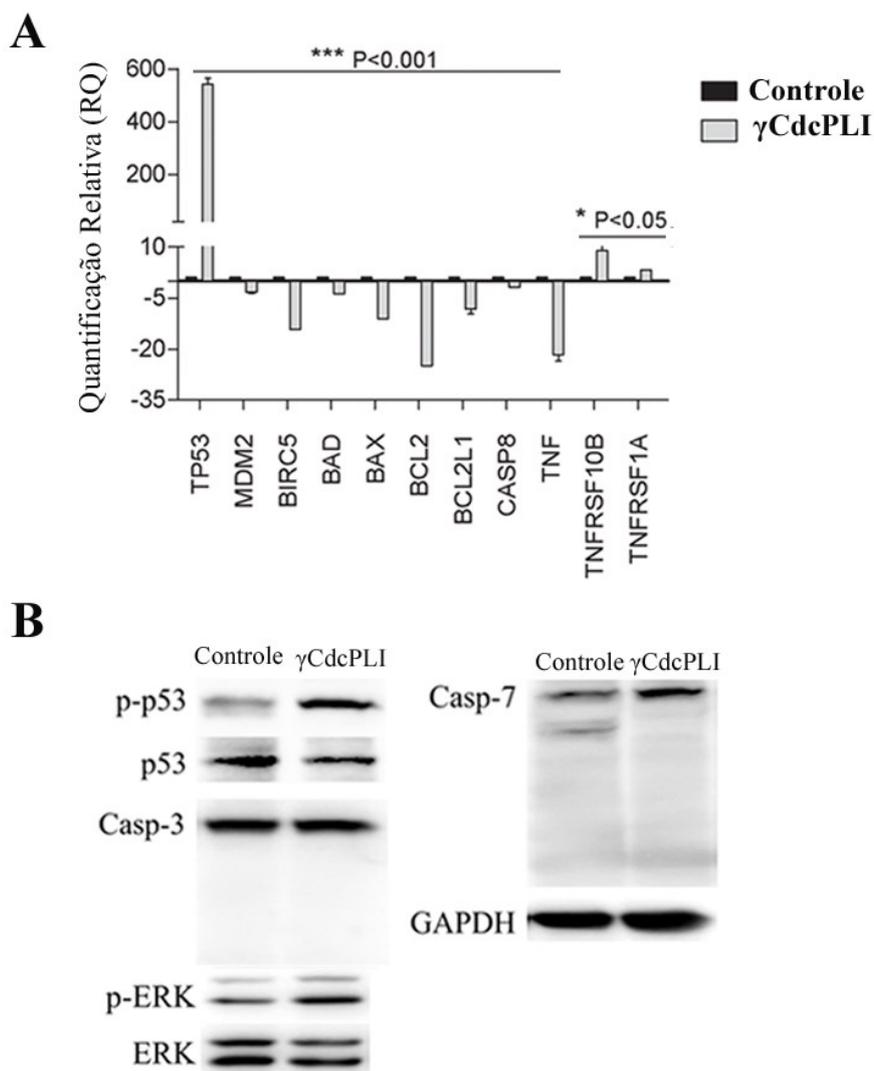


Figura 12: Expressão de genes e proteínas envolvidos na via de apoptose em células de mama MDA-MB-231. **A)** Quantificação relativa da expressão de genes envolvidos com vias de apoptose celular (TP53, MDM2, BIRC5, BAD, BAX, BCL2, BCL2L1, TNF, TNFRSF10B, TNFRSF1A, CASP8) por PCR em tempo real após 24 horas de tratamento das células γ CdcPLI (25 μ g/mL). **B)** Expressão proteica de proteínas relacionadas com indução de apoptose celular por *Western Blotting* (p-p53, p53, Casp-3, p-ERK, ERK e Casp-7 e a proteína constitutiva GAPDH) em células tumorais de mama MDA-MB-231 tratadas por 24 horas com γ CdcPLI (25 μ g/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e analisados por ANOVA *One-way*, *Two-way* e *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ quando comparados com o controle.

4.4 Análise do efeito antimetastático do Inibidor γ CdcPLI

4.4.1 Inibição da adesão de células MDA-MB-231

O inibidor de PLA₂ reduziu a adesão das células MDA-MB-231 em 60 e 75% nas concentrações de 3,125 e 50 μ g/mL, respectivamente (**Figura 13**). Estes dados demonstram a capacidade do inibidor γ CdcPLI em interferir no processo de adesão celular *in vitro* quando avaliado em doses subtóxicas (comparado às condições testadas nos ensaios de citotoxicidade).

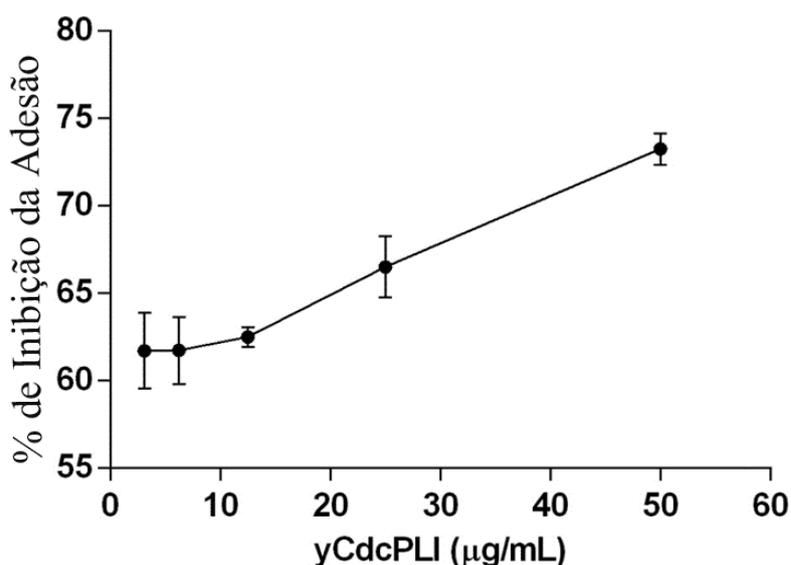


Figura 13: Efeito do γ CdcPLI na adesão celular das células MDA-MB-231. Inibição da adesão de células MDA-MB-231 (3×10^4 células/poço) induzida pelo inibidor de PLA₂ γ CdcPLI em diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 μ g/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

4.4.2 Inibição da migração e invasão celular

O resultado obtido pela técnica de *Wound healing* demonstra que o tratamento com o inibidor na concentração de 25 μ g/mL reduziu a migração das células após 24 horas, quando comparado com o grupo controle (**Figura 14**).

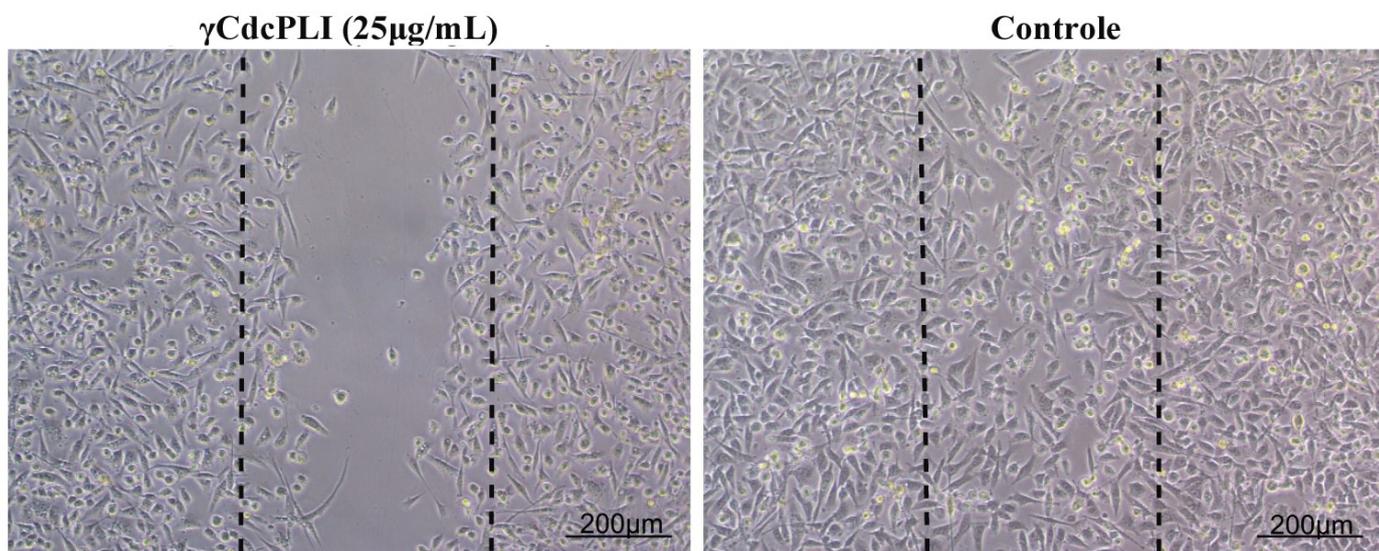


Figura 14: Inibição da migração celular pela técnica de *Wound healing*. Inibição da migração celular das células tumorais de mama MDA-MB-231 (4×10^6 células/poço) após 24 horas de tratamento com o inibidor γ CdcPLI (25 μ g/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

Este efeito foi confirmado pelo ensaio de migração por *Transwell* após o pré-tratamento das células por 30 minutos com o inibidor (25 μ g/mL e 50 μ g/mL). O γ CdcPLI diminuiu a migração das células MDA-MB-231 através da membrana da câmara do *transwell* em aproximadamente 60% em ambas as concentrações (**Figura 15A e 15B**).

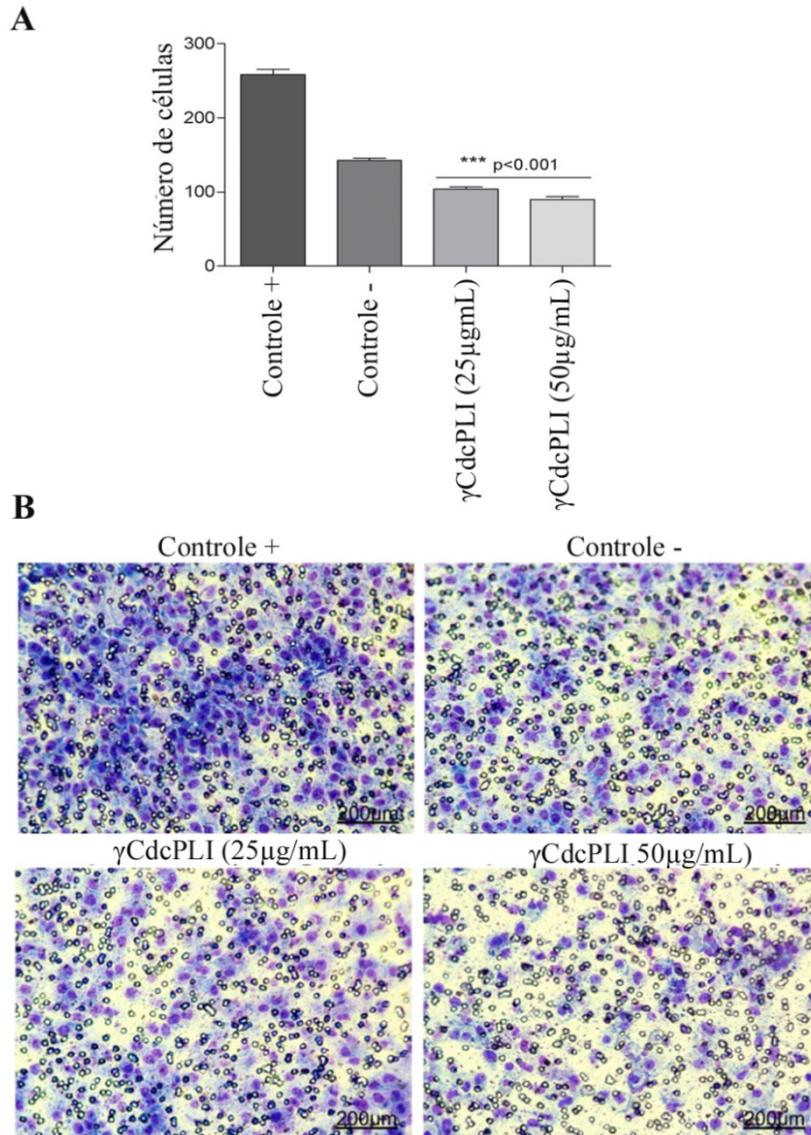


Figura 15: Inibição da migração celular pela técnica de *Transwell*. **A)** Gráfico em barras do número de células MDA-MB-231 (1×10^5 célula/transwell) capazes de migrar após o tratamento com o inibidor γ CdcPLI. **B)** Imagens representativas do ensaio de migração por *Transwell*. **Controle positivo:** meio suplementado com Soro Fetal Bovino 10%; **Controle negativo:** meio de cultura sem Soro Fetal Bovino; **Tratamentos:** Inibidor γ CdcPLI (25 μ g/mL e 50 μ g/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os valores apresentados como média \pm S.E.M; diferenças comparadas entre os tratamentos e controle foram analisados por *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por *** $p < 0,001$.

O ensaio de invasão em Matrigel demonstrou que o tratamento com o inibidor (50µg/mL) foi capaz de reduzir a habilidade de invasão das células tumorais de mama classificadas como altamente metastáticas (87% de inibição) quando comparado com as células controles contendo meio suplementado com SFB 10% (**Figura 16A e 16B**).

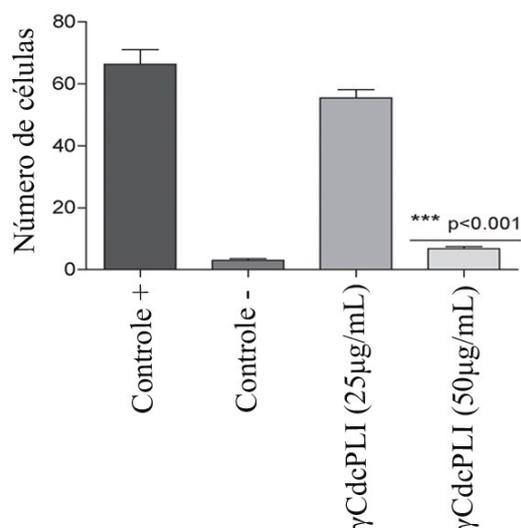
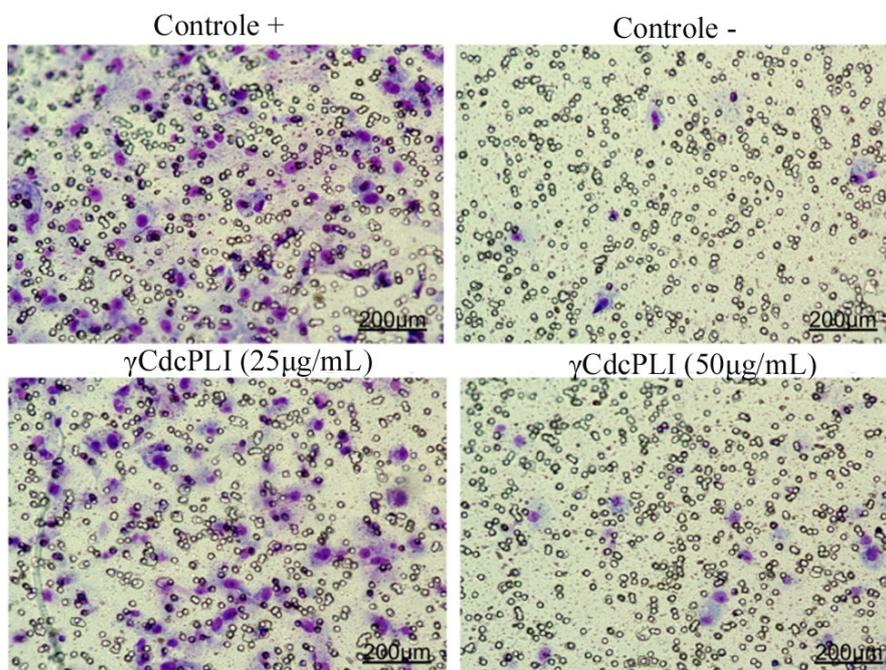
A**B**

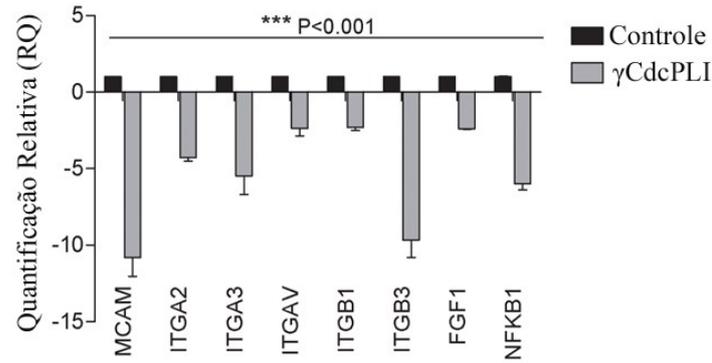
Figura 16: Inibição da invasão celular pela técnica de *Transwell*. A) Gráfico representativo do número de células MDA-MB-231 (1×10^5 célula/transwell) que invadiram a camada de Matrigel após o tratamento com o inibidor γ CdcPLI. B) Imagens representativas do ensaio de invasão por *Transwell*. **Controle positivo:** meio suplementado com Soro Fetal Bovino 10%; **Controle negativo:** meio de cultura sem Soro Fetal Bovino; **Tratamentos:** Inibidor γ CdcPLI (25 μ g/mL e 50 μ g/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os valores apresentados como média \pm S.E.M; diferenças comparada entre os tratamentos e controle foram analisados por *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por *** $p < 0,001$.

4.4.3 Modulação da expressão de genes e proteínas envolvidos com o processo de metástase tumoral

O γ CdcPLI também foi capaz de modular a expressão de importantes genes relacionados com o processo de metástase celular, como os genes MCAM, que codifica a expressão de moléculas de adesão, como a glicoproteína MUC18; os genes ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGAV, ITGB1, ITGB3, que respectivamente codificam a expressão das integrinas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, αV , $\beta 1$ e $\beta 3$; o gene FGF1, que codifica a expressão do Fator de Crescimento de Fibroblasto; e por fim o gene NFKB1, responsável por codificar a expressão da subunidade p105 do Fator Nuclear NF- κ B.

Corroborando com os resultados anteriores, a análise dos dados demonstraram que o tratamento das células tumorais com o inibidor (25 μ g/mL) diminuiu a expressão dos genes MCAM, FGF1 e NFKB1, importantes para a sobrevivência das células, adesão celular, progressão do tumor e metástase. Ademais, o γ CdcPLI regulou negativamente a expressão dos genes envolvidos na codificação da expressão de integrinas $\alpha 2$, $\alpha 3$, αV , $\beta 1$ e $\beta 3$, na concentração de 25 μ g/mL (**Figura 17A**). Porém não foi capaz de reduzir a expressão das integrinas $\alpha 2$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$ presentes na superfície da célula (**Figura 17B**) quando comparado com o controle.

A



B

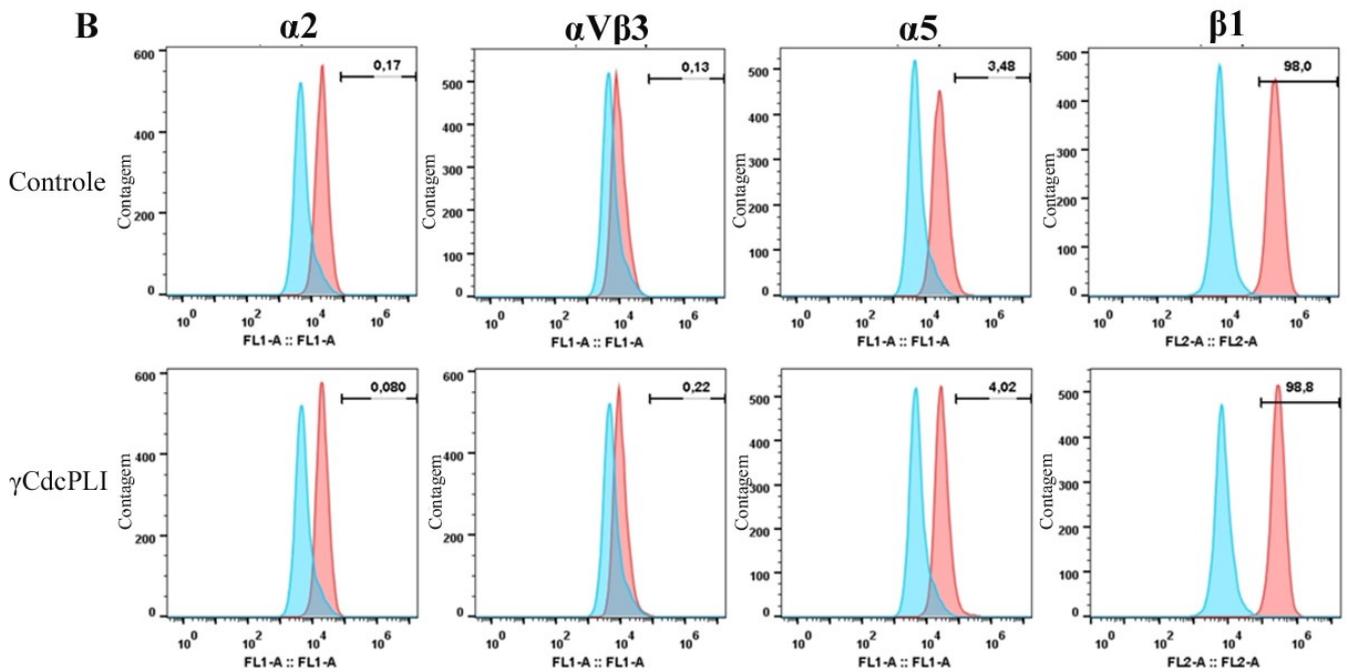


Figura 17: Modulação da expressão de genes e proteínas envolvidas com metástase celular. **A)** Quantificação relativa da expressão de genes em células MDA-MB-231 tratadas com o inibidor γ CdcPLI (25 μ g/mL). **B)** Expressão e reconhecimento de integrinas na superfície das células tumorais MDA-MB-231 após o tratamento com o inibidor γ CdcPLI na concentração de 50 μ g/mL por 1 hora, analisados pelo *software* FlowJo BD Accuri C6. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os valores apresentados como média \pm S.E.M; diferenças comparada entre os tratamentos e controle foram analisados por *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por *** p <0,001.

4.5 Análise do efeito antiangiogênico do inibidor γ CdcPLI em células endoteliais humana (HUVEC)

4.5.1 Citotoxicidade em células HUVEC

O inibidor γ CdcPLI (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,560 μ g/mL) induziu uma baixa citotoxicidade sobre células HUVECs quando comparado com o controle. Em sua maior concentração (50 μ g/mL), o inibidor induziu apenas 40% de citotoxicidade, não sendo possível a determinação do IC₅₀ para as células HUVECs nestas concentrações utilizadas (**Figura 18**).

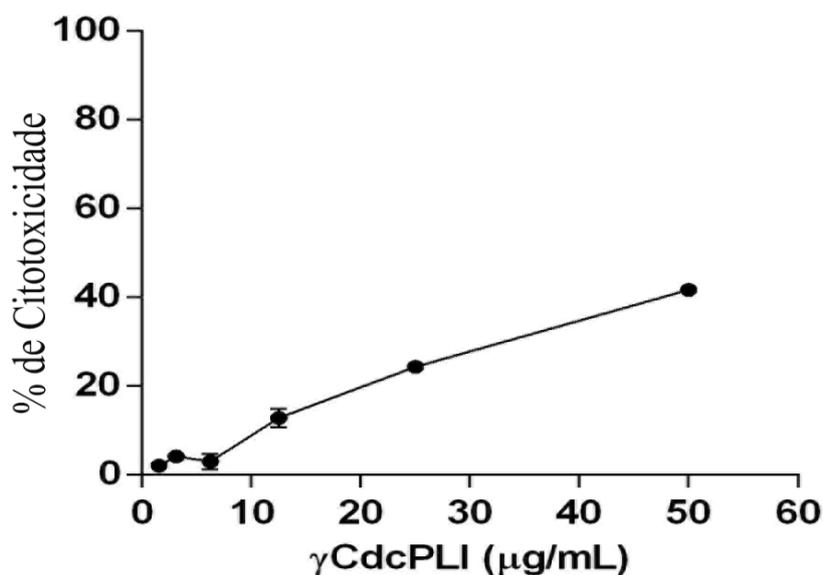


Figura 18: Citotoxicidade em células endoteliais humanas (HUVEC). Porcentagem de citotoxicidade em células HUVECs (3×10^4 células/poço) induzida pelo tratamento com o inibidor γ CdcPLI em diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,560 μ g/mL) após 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

4.5.2 Inibição da adesão e migração de células HUVEC

O inibidor reduziu a capacidade das células HUVEC em aderir aos diferentes componentes da matriz extracelular. O γ CdcPLI (50 μ g/mL) foi capaz de inibir a adesão das células HUVEC aos componentes matrigel, colágeno e fibronectina 34%, 20% e 23% , respectivamente (**Figura 19A**). Tais resultados demonstram que o pré-tratamento com inibidor foi mais eficaz em inibir a adesão das células HUVEC em matrigel quando comparado com as outras proteínas de matriz extracelular.

A análise dos resultados de migração por *Transwell* demonstrou que o pré-tratamento das células HUVECs com o inibidor (25 μ g/mL e 50 μ g/mL) reduziu 34% e 45%, respectivamente a capacidade das células endoteliais em migrar através da membrana do *Transwell* (**p < 0,001) (**Figura 19B e 19C**).

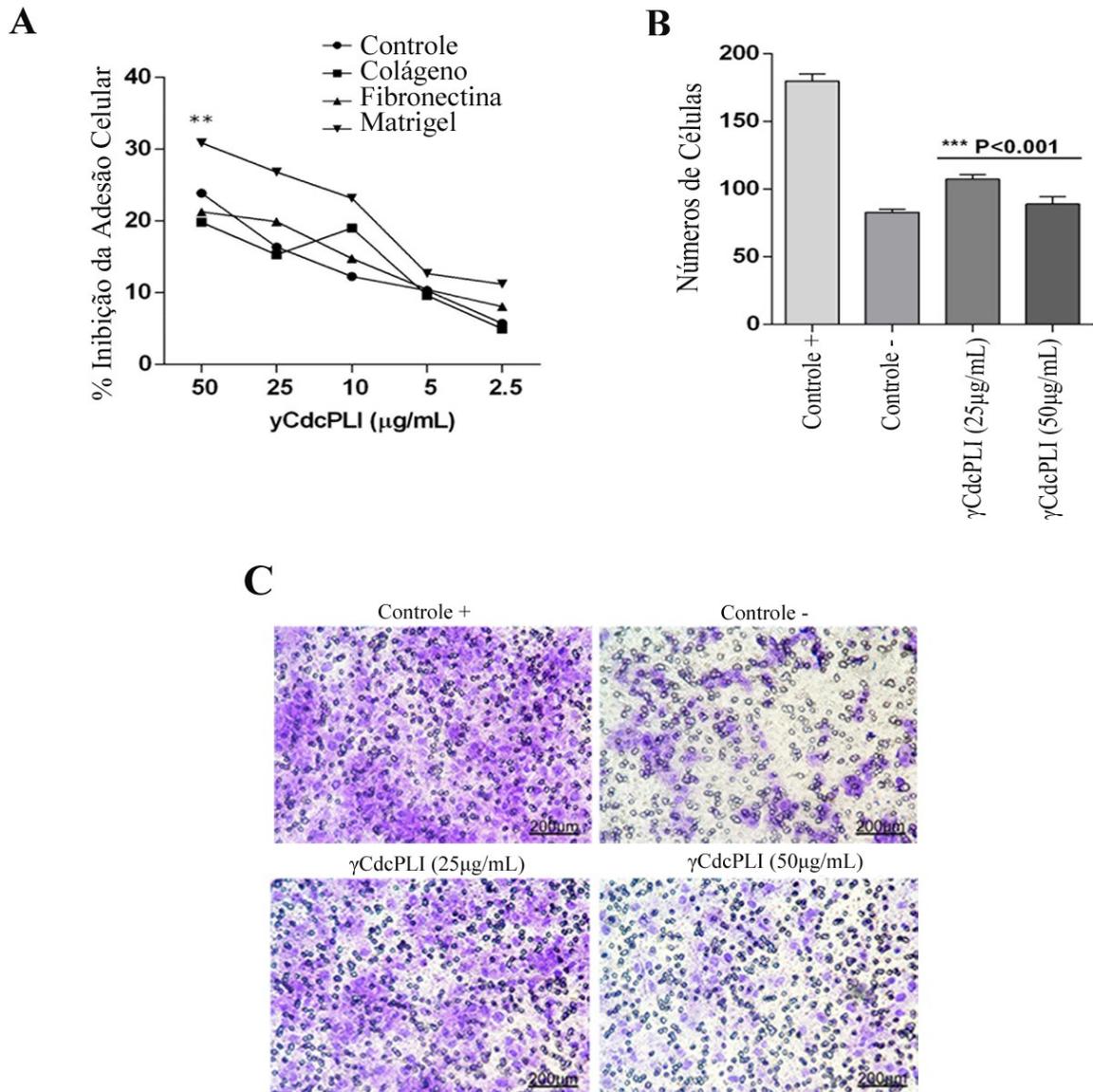


Figura 19: Inibição da adesão e migração de células endoteliais humanas (HUVEC) pela técnica de *Transwell*. **A)** Inibição da adesão celular a componentes da matriz extracelular (Fibronectina, Colágeno e Matrigel) após o pré-tratamento das células (3×10^4 célula/poço) com o γ CdcPLI (50; 25; 10; 5 e 2,5 μ g/mL). **B)** Representação gráfica do número de células que migraram após o pré-tratamento com o inibidor γ CdcPLI (25 μ g/mL e 50 μ g/mL) por 30 minutos. **C)** Imagens representativas da migração das células HUVEC (1×10^5 célula/transwell) pela técnica de *Transwell*. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os valores apresentados como média \pm S.E.M; diferenças comparada entre os tratamentos e controle foram analisados por *Unpaired t-test* e comparação entre os diferentes substratos feito com ANOVA *One-way* e *Two-way*. Valores estatisticamente significativos foram representados por ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$.

4.5.3 Modulação da expressão de genes e proteínas envolvidas na angiogênese

O γ CdcPLI (25 μ g/mL) inibiu a expressão gênica dos fatores de crescimento (VEGFA e VEGFB) e das integrinas ITGA2 (α 2), ITGA3 (α 3), ITGA4 (α 4), ITGB1 (β 1), ITGB3 (β 3) e ITGBV (β V) nas HUVECs (**Figura 20A**). Além disso após tratamento com o γ CdcPLI (50 μ g/mL) foi observado uma menor expressão das integrinas α 2 e α 5 na superfície das células sugerindo um possível reconhecimento dessas moléculas pelo inibidor. Entretanto, o pré-tratamento das HUVECs com o inibidor γ CdcPLI nesta mesma concentração não alterou a expressão das integrinas α V β 3 e β 3 na superfície celular (**Figura 20B e 20C**).

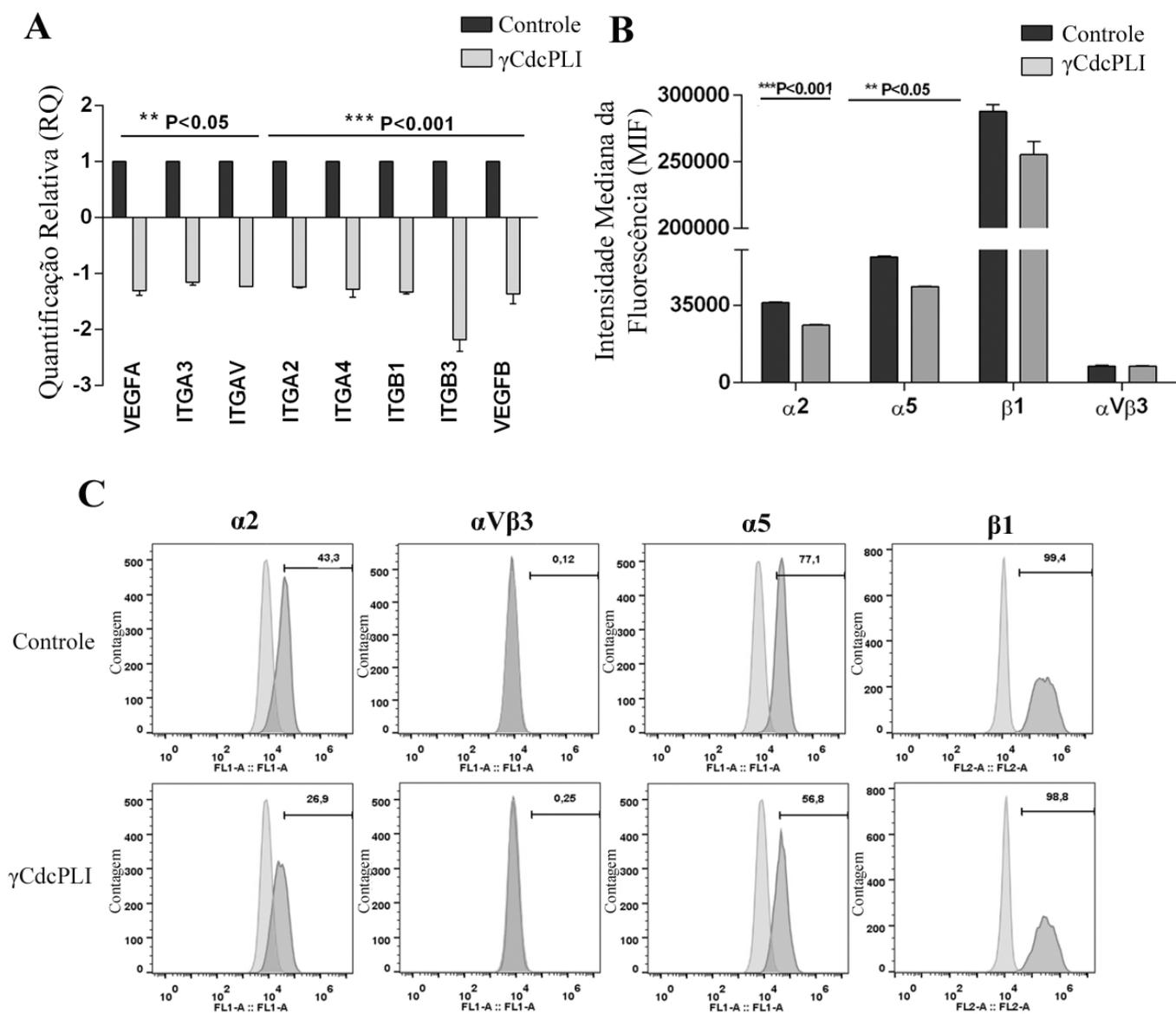


Figura 20: Análise da expressão de genes e proteínas envolvidos na angiogênese. A) Quantificação relativa da expressão de genes em células HUVEC 1×10^5 células/poço (VEGFA, VEGFB, ITGA2, TIGA3, ITGA4, ITGB1, ITGB3 e ITGBV) tratadas com o inibidor γ CdcPLI (25 μ g/mL) por 1 hora. **B)** Representação gráfica da intensidade da mediana de fluorescência das integrinas marcadas na superfície de células HUVEC tratadas com γ CdcPLI (50 μ g/mL) ou sem tratamento (controle). **C)** Gráfico representativo da contagem de células marcadas com as integrinas $\alpha 2$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha 5$ e $\beta 1$, analisados pelo *software FlowJo* BD Accuri C6. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os valores apresentados como média \pm S.E.M; diferenças comparada entre os tratamentos e controle foram analisados por *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$.

4.5.4 Inibição da formação de vasos *in vitro* e dosagem de fator de crescimento endotelial (VEGF)

O tratamento com o γ CdcPLI reduziu significativamente a formação de vasos induzido por bFGF. No ensaio *in vitro* foram quantificados 220 vasos no grupo controle, 105 vasos no grupo tratado com o inibidor (25 μ g/mL) e 5 vasos após tratamento com 50 μ g/mL (**p<0,001) (**Figura 21A e 21B**). Nesse ensaio também houve redução do nível de VEGF presente no sobrenadante dos grupos tratados com o inibidor. Foram quantificados 720pg/mL de VEGF no sobrenadante de células não tratadas (controle) e 160 pg/mL e 10pg/mL de VEGF no sobrenadante de células tratadas com γ CdcPLI (25 μ g/mL e 50 μ g/mL respectivamente) (**p<0,001) (**Figura 21C**).

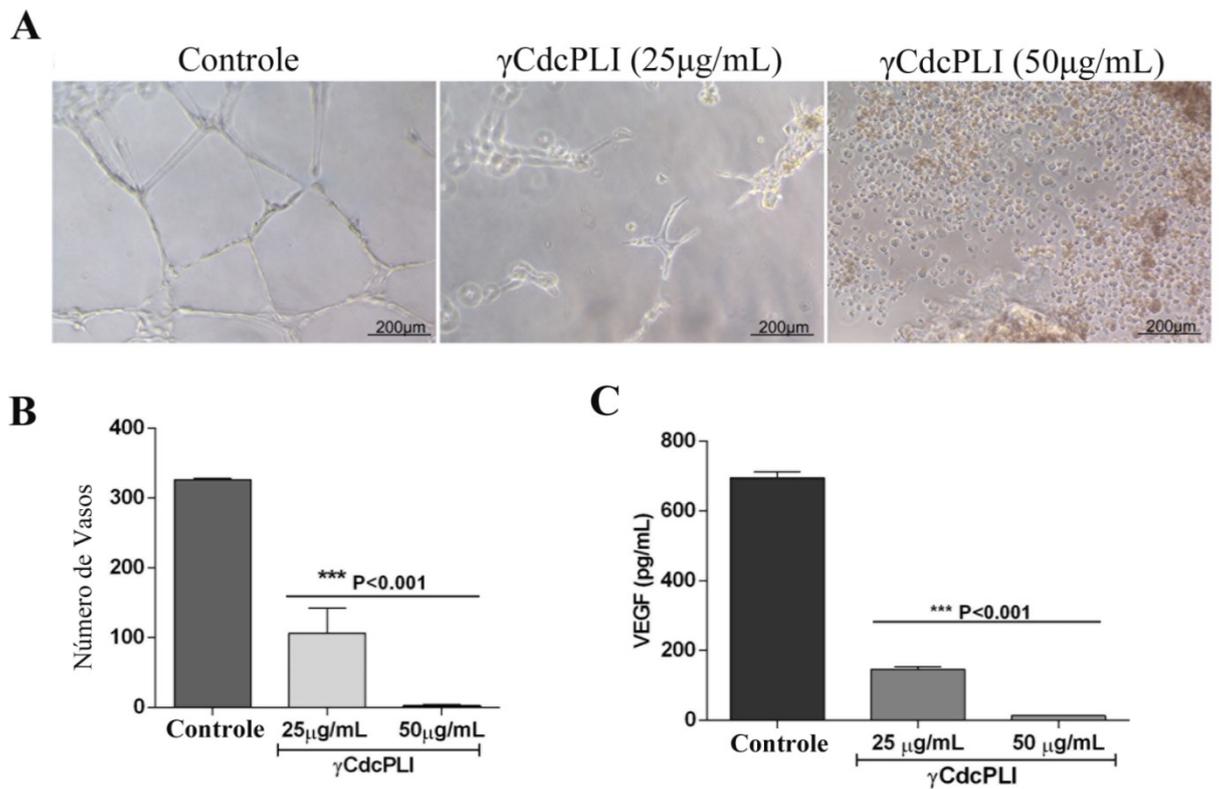


Figura 21: Inibição da formação de vasos *in vitro* por células endoteliais humanas (HUVEC). **A)** Imagens representativas da formação de vasos por células HUVECs após pré-tratamento por 30 minutos com o inibidor (25 μ g/mL e 50 μ g/mL). **B)** Representação gráfica da quantificação do número de vasos formados pelas células HUVEC após 18 horas. **C)** Quantificação do nível de VEGF liberado no sobrenadante das células após a formação de vasos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os valores apresentados como média \pm S.E.M; diferenças comparada entre os tratamentos e controle foram analisados por *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$.

4.5.5 Avaliação da formação de vasos em modelo *ex vivo*

O efeito antiangiogênico do γ CdcPLI foi confirmado pela redução da quantidade de brotamento celular formado a partir dos fragmentos de aorta nos grupos tratados com γ CdcPLI (25 μ g/mL e 50 μ g/mL) no ensaio *ex vivo* (**Figura 22**).

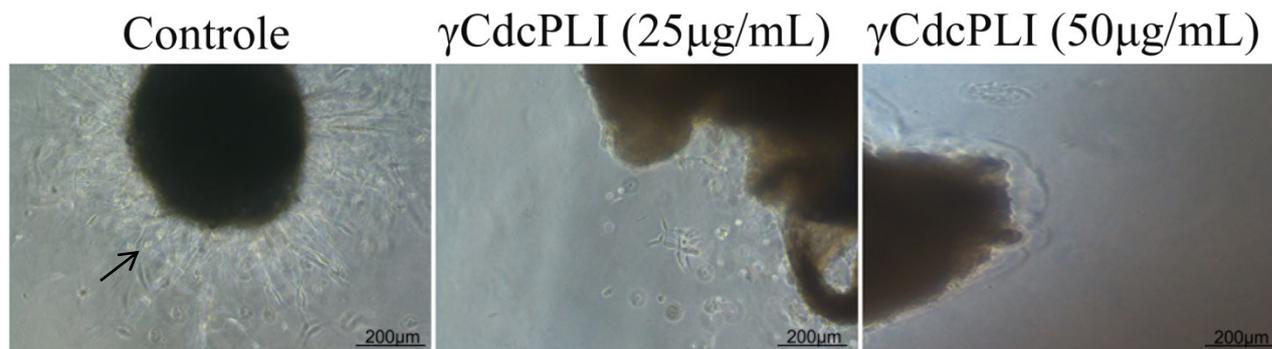


Figura 22: Inibição da angiogênese pelo modelo *ex vivo* (Aortic ring assay). Imagens representativas de brotamentos celulares (indicado pela seta) a partir de fragmento de aorta retirado de camundongos em modelo *ex vivo* após 7 dias de tratamento com inibidor γ CdcPLI (25 μ g/mL e 50 μ g/mL). Este experimento foi realizado em duplicatas independentes.

4.6 Efeito do inibidor γ CdcPLI na via sinalização de fosfolipase A₂ (PLA₂)

4.6.1 Redução dos níveis de prostaglandina E2 (PGE2) e leucotrieno B4 (LKB4) em células tumorais MDA-MB-231 tratadas com γ CdcPLI

Os resultados demonstram que os níveis de PGE2 quantificados no sobrenadante das células tumorais sem tratamento (controle) foram de aproximadamente de 9.556,20pg/mL, enquanto que nas células tratadas com o inibidor (25 μ g/mL) os níveis de PGE2 reduziram para 3.125.24pg/mL (**p<0,001) (**Figura 23**). Assim, o γ CdcLPI inibiu a liberação de prostaglandina E2 no sobrenadante das células em aproximadamente 67%. Os dados obtidos demonstram que o tratamento com o γ CdcPLI não alterou a liberação de Leucotrieno B4 neste tipo celular.

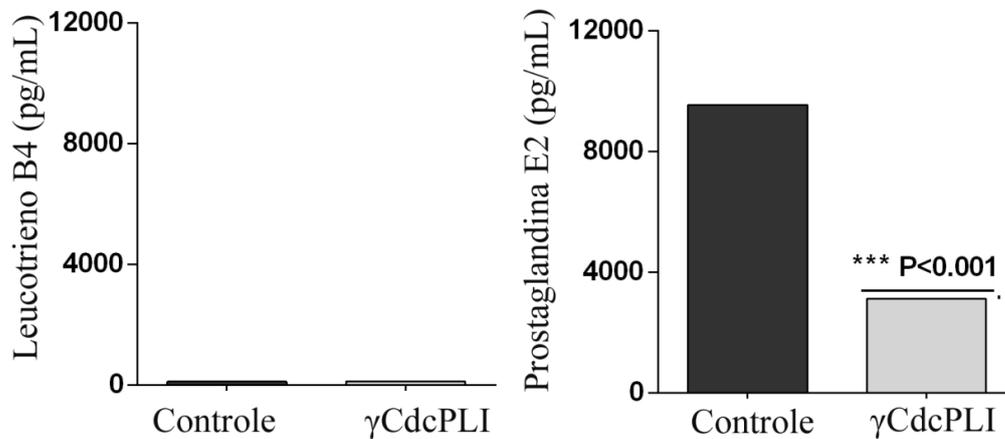


Figura 23: Quantificação dos níveis de Prostanóides liberados pelas células MDA-MB-231. Gráficos representativos da quantidade de Leucotrieno B4 e Prostaglandina E2 liberados nos sobrenadantes das células MDA-MB-231 (4×10^6 células/poço) após o tratamento com o inibidor γ CdcLPI (25 μ g/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os valores apresentados como média \pm S.E.M; diferenças comparada entre os tratamentos e controle foram analisados por *Unpaired t-test*. Valores estatisticamente significativos foram representados por *** $p < 0,001$.

4.6.2 Modulação da expressão gênica e proteica de componentes da via da PI3K/AKT em células tumorais MDA-MB-231

O inibidor (25 μ g/mL) regulou negativamente a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas com a via do PI3K/AKT, como AKT1, AKT3 e PI3KR1 (**Figura 24A**). Corroborando com esses resultados, demonstramos que o tratamento com o γ CdcPLI reduziu os níveis da forma fosforilada ativa da proteína AKT (p-AKT) nas células MDA-MB-231 (**Figura 24B**).

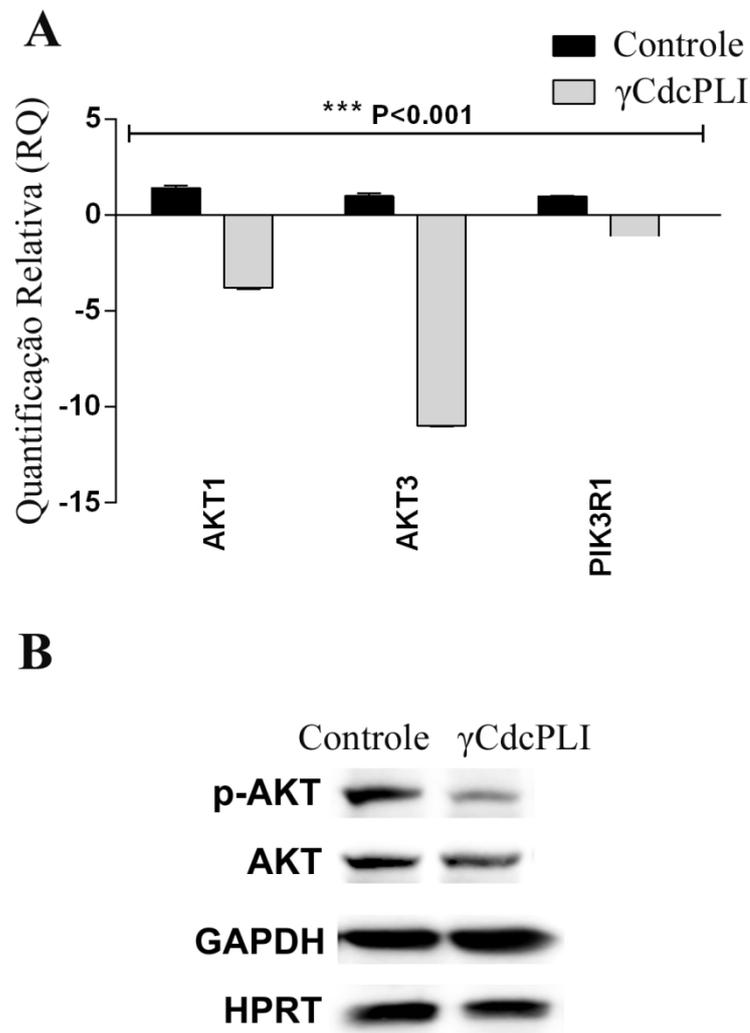


Figura 24: Expressão de genes e proteínas envolvidos na via PI3K/AKT em células MDA-MB-231. **A)** Quantificação relativa da expressão de genes envolvidos com vias de sobrevivência celular (AKT1, AKT3 e PIK3R1) realizada por PCR em tempo real após 24 horas de tratamento das células com γ CdcPLI (25 μ g/mL). **B)** Expressão proteica de proteínas relacionadas com vias de apoptose celular realizada por Western Blotting (p-AKT, AKT e a proteína constitutiva HPRT e GAPDH) em células MDA-MB-231 tratadas com γ CdcPLI (25 μ g/mL) após 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e as diferenças comparadas entre os tratamentos e controle foram analisados por ANOVA One-way, Two-way e Unpaired t-test. Valores estatisticamente significativos foram representados por *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$.

5.0 Discussão

O envolvimento de PLA₂s como mediadores carcinogênicos em diferentes tipos de câncer (Cummings, 2007; Mannello *et al.*, 2008; Hernandez *et al.*, 2010) abre perspectivas para a busca de moléculas capazes de reconhecer e inibir a ação de PLA₂ em células tumorais e o uso destas em terapias antitumorais (Donnini *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Neste presente trabalho, demonstramos o efeito antitumoral, antimetastático em células de tumor mamário altamente metastático (MDA-MB-231) e antiangiogênico e células endoteliais humanas (HUVEC), de um inibidor de PLA₂ purificado do soro de *Crotalus durissus collilineatus* (*C. d. collilineatus*), utilizando ensaios *in vitro* e *ex vivo*.

O inibidor de PLA₂ (γ CdcPLI) é uma glicoproteína ácida com massa molecular de 22.344 kDa para cada monômero. A estrutura secundária é composta por 22% de alfa-hélices e 29% de folhas-beta. Este é capaz de formar oligômeros de acordo com o aumento da temperatura (Gimenes *et al.*, 2014). Sua estrutura primária foi completamente sequenciada revelando os sítios de glicosilação predito N-Glicosilado (ligado ao resíduo de Asparagina) e experimental O-Glicosilado (ligado ao resíduo de Serina). O sítio de N-glicosilação conservado nos diferentes inibidores de PLA₂ (Ans-Xaa-Ser/Thr) foi encontrado na posição 156 – 158 da sequencia primária do γ CdcPLI (Fortes-Dias, 1991; Okumura *et al.*, 1998; Thwin *et al.*, 2002; Estevao-Costa *et al.*, 2008; Shirai *et al.*, 2009).

O alinhamento do γ CdcPLI com outros inibidores da mesma classe demonstrou alta homologia com outros inibidores da classe γ , sendo encontradas apenas algumas modificações pontuais de resíduos de aminoácidos. Apesar da distância evolutiva entre as diferentes espécies de serpentes, mesmo entre diferentes gêneros, como *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*, os inibidores da classe γ possuem uma alta similaridade, a qual pode ser atribuída a um fator de convergência evolutiva (Estevão-Costa, 2008).

Como foi demonstrado em estudos anteriores o inibidreconhecer e inibir a atividade enzimática e miotóxica de PLA₂ isoladas de peçonha de serpente (Gimenes *et al.*, 2014). Porém, até o momento não foi demonstrado sua capacidade em inibir a atividade inflamatória desencadeada por PLA₂ de peçonha de serpentes. Dessa forma, o presente estudo avaliou a capacidade do γ CdcPLI em inibir o efeito pró-inflamatório induzido pela PLA₂ básica BnSP-7 obtida a partir da peçonha de *Bothrops pauloensis* (Soares *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2009).

A PLA₂ BnSP-7 foi utilizada por demonstrar homologia com sPLA₂ humana (**Figura 25**). Os efeitos *in vitro* e *in vivo* observados após a inibição da BnSP-7, como redução da liberação de PGE₂, diminuição de citocinas pró-inflamatória e redução do edema em pata de camundongos, podem sugerir possíveis alvos em células tumorais humanas que aumentam a expressão de PLA₂ secretórias. Estes dados preliminares quanto a capacidade anti-inflamatória do inibidor γ CdcPLI corroboram para que os efeitos observados em células tumorais se deve a sua capacidade de diminuir o potencial pró-inflamatório de sPLA₂s altamente expressas nas células **MDA-MB-231**.

```

sPLA2 Humana   MKTLLLLLAVIMIFGLLQAHGNLVNFHRMIKLTGKEAALSYGFGCHCGVGGGRGSPKDAT
BnSP-7         -----SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCVGLGRGQPKDAT
                .*.::: .**   **:. *  **  **.* **  **.* **
sPLA2 Humana   DRCCVTHDCCYKRLEKRGCGTKFLSYKFSNSGSRITCAKQDSCRSQLCECDKAAATCFAR
BnSP-7         DRCCYVHKCCYKLT--GCDPKKDRYSYSWKDT-IVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRE
                *** .*.***.*  **..*  *.:*...: *.*.:...* .:*****.* *:
sPLA2 Humana   NKTYNKKYQYYSNKHCRGSTPRC
BnSP-7         NLGTYNKKYRYHLKPFCKKADP-C
                *  *****.*: : .*. : * *

```

Figura 25: Alinhamento da sequência de aminoácidos de um PLA₂ secretória humana com a PLA₂ BnSP-7. Destaque em verde para o resíduo na posição 49. As sequências foram obtidas no PDB Data e o alinhamento realizado com a *Web Tools* ClustalW (MUSCLE). (*) indica resíduo de aminoácido conservado; (:) indica que houve uma modificação de aminoácido com mesmas características; (.) indica modificação de aminoácido de grupo diferente.

Apesar destes resultados preliminares, o real mecanismo de ação do γ CdcPLI sobre as células MDA-MB-231 ainda não foi explorado, porém este poderia reconhecer PLA₂ secretórias (sPLA₂) e / ou PLA₂ citosólicas (cPLA₂), suprimindo a capacidade destas enzimas em liberar mediadores lipídicos e moléculas pró-inflamatórias, responsáveis por ativar vias de proliferação e sobrevivência (Cummings, 2007; Vasilakaki *et al.*, 2016).

Thwin e colaboradores (2002) demonstraram que um inibidor de PLA₂ purificado a partir do soro da serpente *Python sebae*, denominado como PIP, foi capaz de reconhecer e diminuir a capacidade inflamatória de diferentes PLA₂ obtidas a partir da peçonha de serpentes, da classe I, II e III. Além disso, neste trabalho foi descrito a provável região localizada no inibidor PIP responsável pelo reconhecimento e inibição da atividade inflamatória da PLA₂ (Thwin *et al.*, 2000; Thwin *et al.*, 2002). Esta região também foi identificada no inibidor γ CdcPLI compreendida pelo fragmento “PGEPLSKPNG”, fato este que reforça a capacidade do inibidor em diminuir o ambiente pró-inflamatório induzido por PLA₂s.

O potencial antitumoral do γ CdcPLI foi inicialmente demonstrado em diferentes linhagens de câncer. O γ CdcPLI apresenta uma maior capacidade citotóxica contra células tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) em comparação com as demais linhagens de células tumorais avaliadas (HeLa, A549 e PC3). Além disso, quando testado em células de mama não tumorais (MCF 10A), esta citotoxicidade foi menor sugerindo uma preferência por alvos nas células tumorais, uma vez que estas são conhecidas por expressar mais PLA₂ (possível alvo celular do inibidor γ CdcPLI), em comparação com as células não tumorais (Brglez, Pucer, *et al.*, 2014). Esta característica é importante para o aspecto do desenvolvimento de novos modelos de

drogas para a terapia do câncer, em especial do câncer triplo negativo e altamente metastático por ser resistente aos tratamentos convencionais utilizados, característica principal das células MDA-MB-231 (Phadke *et al.*, 2008; Wlodkowic *et al.*, 2011).

O efeito citotóxico sobre células MDA-MB-231 pode ser relacionado a indução de apoptose observada após o tratamento com o γ CdcPLI. A via intrínseca da apoptose é mediada por mecanismos mitocondriais, sendo reguladas por fatores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W e Mcl-1) e fatores pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bid, Bmf, dentre outros) (Elmore, 2007). O γ CdcPLI induziu uma regulação negativa da expressão de genes antiapoptóticos associados com a via intrínseca da apoptose, como o Bcl-2 e o BCL2L1. Porém, o tratamento com o γ CdcPLI também diminuiu a expressão de genes relacionados com a expressão de fatores pró-apoptóticos, como BAD e BAX. Além disso, o tratamento não foi capaz de ativar e modular a expressão proteica das Caspases 3 e 7, analisada por *Western blotting*. Estas duas caspases são importantes enzimas para a fase de execução da via de apoptose, no qual as vias intrínsecas e extrínsecas terminam (Slee *et al.*, 2001).

A via extrínseca da apoptose por outro lado, tem sido correlacionada com alguns membros da família de receptores transmembrânicos de fatores necróticos, como os receptores FasL/Faz, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5, sendo que seus respectivos ligantes desencadeiam cascatas de sinalização intracelular (Locksley *et al.*, 2001). Estes sinais intracelulares atuam diretamente na mitocôndria, causando danos na membrana mitocondrial e conseqüentemente sua perda do potencial de membrana, liberando assim proteínas pró-apoptóticas no citoplasma celular (Saelens *et al.*, 2004; Elmore, 2007). Interessantemente, o inibidor γ CdcPLI foi capaz de aumentar a expressão dos genes responsáveis pela codificação de receptores de TNF- α , como os genes TNFRS10B e TNFRSF1A. Apesar deste aumento na expressão destes

receptores, o tratamento reduziu a expressão do gene que codifica o TNF e Caspase 8. Embora alguns resultados obtidos neste trabalho demonstrem que o γ CdcPLI induziu a modulação de alguns genes que dificultam a indução da apoptose celular, a principal resposta ao estímulo sobre as células MDA-MB-231 após o tratamento com o inibidor foi a regulação positiva de genes pró-apoptóticos, que corroboram com as observações encontradas sobre a morte celular realizadas com os nossos testes com Anexina V.

Na literatura apenas um trabalho demonstrou o efeito antitumoral de inibidor do tipo γ de PLA₂ purificado a partir do soro de serpentes. O γ PLI isolado do soro de *Python sebae* demonstrou um efeito citotóxico, antiproliferativo e apoptótico em diferentes linhagens de células tumorais, incluindo células de câncer de mama (Donnini *et al.*, 2011).

Além das vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose foram investigados também a modulação de outros fatores, conhecidos como mediadores do processo de apoptose celular, como por exemplo as vias da MAPK-ERK e a via do p53. A expressão da proteína p53 (supressor tumoral) está relacionada com a ativação da expressão de genes pró-apoptóticos (Baker *et al.*, 1989; Finlay *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1990), prevenindo assim o estabelecimento e progressão do estado oncológico (Bourdon *et al.*, 2002). A perda da função da proteína p53 promove defeitos no mecanismo natural de morte celular, principalmente durante o processo de *checkpoint* do ciclo celular, além de promover imortalização, proliferação e sobrevivência das células tumorais (Hussain e Harris, 1998; Hollstein *et al.*, 1999). γ CdcPLI induziu um aumento de 600 vezes a expressão do gene TP53 em comparação com as células controle. Esta modulação da expressão gênica foi comprovada pela fosforilação da proteína p53 em sua forma ativa (p-p53). O flavonoide *Thymoquinone*, obtido a partir do óleo das sementes de *Nigella sativa* também induz apoptose a partir da modulação da expressão de p53 (Majdalawieh

et al., 2017). Outro exemplo de molécula com esta característica de ativar apoptose em células tumorais é a BDMC-A, um análogo da *Curcumina*, obtido do rizoma de *Curcuma longa* (El-Mahdy *et al.*, 2005; Mohankumar *et al.*, 2014; Tuorkey, 2014).

Outro importante gene analisado e que também está envolvido com a apoptose pela via de sinalização do p53 é o BIRC5, também conhecido como Survivina. Esta proteína é descrita como um membro da família de proteínas inibidoras da apoptose (IAP) (Ambrosini *et al.*, 1997). A expressão elevada de BIRC5 em células do câncer de mama, como MCF-7 e MDA-MB-231, aumenta diretamente os níveis de MDM2, e em decorrência deste aumento a expressão de p53 diminui, inibindo assim o efeito apoptótico induzido pela via do p53 (Gottlieb *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). A proteína MDM2 por sua vez tem sua expressão aumentada em diversas linhagens de células tumorais, sendo esta responsável por ligar na proteína p53 e direcioná-la para vias de degradação lisossomal, garantindo assim que as células tumorais escapem da via apoptótica regulada por p53 (Oliner *et al.*, 1992). Com base nesses dados, foi demonstrado que o inibidor γ CdcPLI induziu uma regulação negativa da expressão de MDM2 e BIRC5 em células MDA-MB-231 após o tratamento de 24 horas. Estes resultados podem corroborar com os dados observados no aumento da expressão e da presença da proteína p53 ativa nas células tumorais testadas, confirmando o efeito apoptótico induzido pelo inibidor neste tipo celular.

O inibidor γ CdcPLI aumentou a ativação da proteína ERK em sua forma fosforilada, ou seja, ativa (p-ERK) em células MDA-MB-231 após o tratamento. A via MAPK-ERK é uma importante via de proliferação celular, porém quando ocorre estresse celular esta mesma via pode ser ativada e induzir a célula a um estado apoptótico (Dhillon *et al.*, 2007). Com base nos resultados anteriormente discutidos com o tratamento das células com o inibidor de PLA₂ γ CdcPLI, esta via pode ter sido

ativada e contribuído para potencializar a indução do efeito apoptótico nas células do câncer de mama.

Além da resistência a morte celular são descritos seis importantes eventos moleculares envolvidos na carcinogênese, como ativação de vias proliferativas, evasão de supressores de crescimento, imortalidade, ativação de processos de invasão, metástase e angiogênese (Hanahan e Weinberg, 2011). O processo metastático de células tumorais é considerado o evento de maior importância e um dos responsáveis pelo aumento da malignidade do câncer. Este processo depende da capacidade dessas células em aderir, migrar e invadir outros tecidos (Hunter *et al.*, 2008). Neste contexto, foi demonstrado a capacidade do inibidor γ CdcPLI em diminuir a adesão, migração e invasão das células MDA-MB-231 em modelos *in vitro*. Além da evidência de que o tratamento das células com o inibidor seria capaz de diminuir a regulação de genes relacionados com a expressão de moléculas pró-metastáticas, como integrinas ($\alpha 2$, $\alpha 3$, αV , $\beta 1$ e $\beta 3$), fatores de crescimento (FEF-1) e moléculas de adesão (MCAM).

As integrinas são compostas estruturalmente por duas subunidades, α e β , que formam 24 heterodímeros, sendo capazes de mediar a adesão celular e a interação célula com proteínas da matriz extracelular (Hynes, 2002; Xiong *et al.*, 2013). No processo de progressão tumoral, as integrinas e outras moléculas de adesão, bem como fatores de crescimento são importantes para o controle da sobrevivência, diferenciação e proliferação celular (Chow *et al.*, 1998; Ornitz e Itoh, 2001; Guo e Giancotti, 2004; Slattery *et al.*, 2013). De acordo com os resultados obtidos com o tratamento das células MDA-MB-231 com o inibidor, o gene que codifica a integrina $\beta 3$ foi o gene que sofreu maior regulação negativa. A integrina $\beta 3$ é responsável por reconhecer e ligar-se a algumas proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, laminina e vitronectina,

tendo papel importante na adesão e migração celular (Ornitz e Itoh, 2001; Guo e Giancotti, 2004).

O fator de crescimento de Fibroblasto (FGF) é outro importante regulador no processo de crescimento, diferenciação e angiogênese em células tumorais (Slattery *et al.*, 2013). O FGF liga-se em seu receptor e desencadeia a ativação de cascatas de sinalização intracelular, principalmente a via Ras/MAPK, além de sinalizar a ativação da progressão tumoral (Grose e Dickson, 2005; Presta *et al.*, 2005). Neste mesmo sentido, a molécula de adesão MCAM é uma glicoproteína de membrana cálcio-independente que contém diversos motivos conservados responsáveis por reconhecer proteínas do tipo quinases. Este reconhecimento sugere que a molécula MCAM participa de diferentes vias de sinalização celular. Sendo que alguns estudos demonstraram que sua expressão quando exacerbada em diferentes linhagens de células tumorais está associada com os processos de progressão e metástase, em especial no câncer de mama, pulmões e próstata (Anfosso *et al.*, 2001; Zabouo *et al.*, 2009). O inibidor γ CdcPLI diminuiu a capacidade destas células em aderir, migrar e invadir, por modular a expressão de genes envolvidos no mecanismo de metástase celular.

A angiogênese é um dos processos importantes para o favorecimento da metástase e do remodelamento tumoral (Folkman, 2002; Nishida *et al.*, 2006). O processo de angiogênese é definido como a formação de novos vasos endoteliais a partir de vasos sanguíneos pré-existentes (Folkman e Shing, 1992; Folkman e D'amore, 1996). Neste contexto, quando as células recebem estímulos pró-angiogênicos, o endotélio celular atua para estabelecer a migração, proliferação, aderência e alinhamento celular para permitir a formação de novos vasos sanguíneos (Hirschi e D'amore, 1996; Bischoff, 1997). A angiogênese tumoral é importante para o estabelecimento de um ambiente favorável ao crescimento do tumor, uma vez que estes novos vasos garantem o

abastecimento com nutrientes e oxigênio para o metabolismo celular e invasão em tecidos adjacente com tropismo às células tumorais (Folkman, 1995; Hirschi e D'amore, 1996; Bischoff, 1997).

As células endoteliais humanas (HUVEC) quando tratadas com o inibidor γ CdcPLI na concentração de 50 μ g/mL, diminuíram a capacidade de aderir em proteínas da matriz extracelular e migrarem. Além disso, o tratamento com o inibidor modulou negativamente a expressão gênica de proteínas pró-angiogênicas, como as integrinas α 2, α 3, α 4, α V, β 1 e β 3. A fim de corroborar com estes resultados da expressão gênica, a análise pelo ensaio de Citometria de fluxo com as integrinas marcadas, demonstrou que o tratamento com o inibidor na concentração de 50 μ g/mL diminuiu a expressão das integrinas α 2 e α 5 presente na membrana das células HUVECs. Estes dados sugerem que o inibidor possa reconhecer e se ligar a estas moléculas, justificando assim a diminuição da capacidade destas em aderir às proteínas da matriz extracelular.

As integrinas α 2 e α 5 presentes na membrana celular são receptores para ligação das células ao colágeno e a fibronectina, proteínas presentes na matriz extracelular (Sisci *et al.*, 2010). Até o presente momento, não há relatos na literatura que demonstrem a capacidade de inibidores de PLA₂ do tipo γ obtidos a partir do soro/plasma de serpentes em reconhecer especificamente integrinas e se ligar a elas. Porém, há relatos de algumas proteínas de serpente com esta característica de se ligar a integrinas e modular efeitos anti-angiogênicos, como por exemplo, desintegrinas, as Lectinas tipo-C e algumas Fosfolipases A₂ (Bazaa *et al.*, 2010; Jebali *et al.*, 2014; Montassar *et al.*, 2016). Interessantemente, os resultados de adesão celular após o tratamento das células HUVEC com o inibidor γ CdcPLI demonstraram que os melhores valores de inibição da adesão celular foi para o substrato Matrigel e fibronectina, substratos aos quais as integrinas α 2 e α 5 são responsáveis pelo reconhecimento e

ligação. Os resultados, de modulação da expressão gênica, a análise proteica por Citometria de fluxo e a inibição da adesão em diferentes substratos quando analisados em conjunto sugerem então que o inibidor foi capaz de reduzir a capacidade de formação de novos vasos das células HUVEC, que seria investigado pelos testes *in vitro* e *ex vivo*.

Dessa forma, foi analisada a capacidade do inibidor em reduzir a formação de vasos induzidos por bFGF (fator de crescimento) em células HUVEC, realizado por testes *in vitro*, nas concentrações de 25 e 50µg/mL. De posse dos resultados, foi demonstrado que o γ CdcPLI foi capaz de inibir a formação de tubos em células HUVECs, sendo que uma possível justificativa para esse efeito, além da capacidade já demonstrada em diminuir adesão e migração em células endoteliais, seria a redução do nível de VEGF produzido pelas células após o pré tratamento, sugerindo então um possível mecanismo pelo qual o γ CdcPLI atuaria. Vale destacar que o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um dos principais fatores pró-angiogênico, sendo este altamente expresso em 60% dos pacientes diagnosticados com câncer de mama (Relf *et al.*, 1997). O VEGF é responsável por estimular a proliferação e migração de células endoteliais durante o processo de angiogênese tumoral, favorecendo assim um ambiente com condições favoráveis para a formação de novos vasos e progressão tumoral (Fitzpatrick *et al.*, 2003; Loureiro e D'amore, 2005).

A fim de corroborar e reforçar os achados de inibição da formação de vasos em testes *in vitro* foram feitos testes em modelo *ex vivo* para avaliar a formação de brotamentos de células endoteliais a partir de um vaso pré existente, utilizado neste caso fragmentos de aorta renal de camundongos Balb-c. Os resultados comprovaram que o inibidor γ CdcPLI diminuiu a capacidade dos vasos pré-existente em formar novos brotamentos no período de 7 dias. São encontrados na literatura alguns trabalhos que

identificaram por meio de ensaios de imunofluorescência neste modelo de aorta *ex vivo*, a presença de células endoteliais e células de suporte, denominadas pericitos, além de demonstrar diferentes aspectos celular e molecular da angiogênese por meio desta técnica (Relf *et al.*, 1997; Fitzpatrick *et al.*, 2003; Sisci *et al.*, 2010). Dessa forma, de acordo com os resultados demonstrados na literatura, o ensaio de *aortic ring* poderia ser um referencial para a confirmação do potencial antiangiogênico do inibidor γ CdcPLI.

Abu, et al., 2016 demonstraram o efeito antitumoral, antimetastático e antiangiogênico de um composto flavonoide denominado Flavokawain B, encontrado na planta *Piper methysticu*, pertencente a família das *Piperaceae*, popularmente conhecida como Kava-kava (Abu *et al.*, 2016). Neste trabalho foi demonstrado que a *Flavokawain B*, além do efeito antitumoral em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, foi capaz de regular o processo de angiogênese assim como o γ CdcPLI, diminuindo a formação de vasos em modelos *in vitro* utilizando células HUVEC, e também em modelo *ex vivo* pelo ensaio de anel aórtico (Sheng *et al.*, 2001; Kamal *et al.*, 2016).

A via do PI3K/AKT tem papel fundamental na proliferação, sobrevivência, angiogênese e progressão tumoral, principalmente no câncer de mama (Dillon *et al.*, 2007). O bloqueio de qualquer mediador relacionado com o metabolismo dos Ácidos Araquidônicos (AA), peças chaves para a ativação desta via, seria um potencial modelo para inibir também a progressão do câncer de mama. Assim, investigamos se os efeitos desencadeados pelo γ CdcPLI demonstrados em células do câncer de mama MDA-MB-231, poderiam ser relacionados com a ação na via do PI3K/AKT, que é descrita por ter participação de Fosfolipases A₂ em sua ativação a partir do seus produtos de reação, como os eicosanoides Leucotrieno B₄ e Prostaglandina E₂ (Toulany e Rodemann, 2015; Majumder *et al.*, 2016).

O inibidor de PLA₂ γ CdcPLI foi capaz de interferir na liberação de AA pelas células MDA-MB-231, uma vez que após o tratamento os níveis de PGE2 liberados no sobrenadante reduziram em comparação com as células controle sem tratamento. O PGE2 é descrito como uma molécula altamente expressa em células do câncer de mama, especialmente em células caracterizadas por serem altamente invasiva e metastática, como por exemplo, a linhagem de células MDA-MB-231 (Li *et al.*, 2013; Safdari *et al.*, 2015).

Além dessa diminuição na liberação de eicosanoides o tratamento das células tumorais com o inibidor γ CdcPLI diminuiu a expressão de genes envolvidos diretamente com a via do PI3K/AKT, como os genes PI3KR1, Akt1, Akt3 e principalmente diminuiu a expressão da forma ativa fosforilada da proteína AKT (p-AKT). Foram demonstrados em alguns compostos sua propriedade antitumoral por interferir na ativação da via do PI3K/AKT, uma vez que inibem diferentes enzimas que fazem parte das vias de AA e conseguem então inibir o crescimento celular e induzir a apoptoses em células do câncer de mama (Li *et al.*, 2013; Safdari *et al.*, 2015). A figura 26 resume os efeitos induzidos nas células MDA-MB-231 após o tratamento com o inibidor de PLA₂ γ CdcPLI, demonstrando a modulação da expressão de diferentes genes e proteínas chaves nos processos de proliferação e metástase, sobrevivência celular e vias de sinalização de apoptose

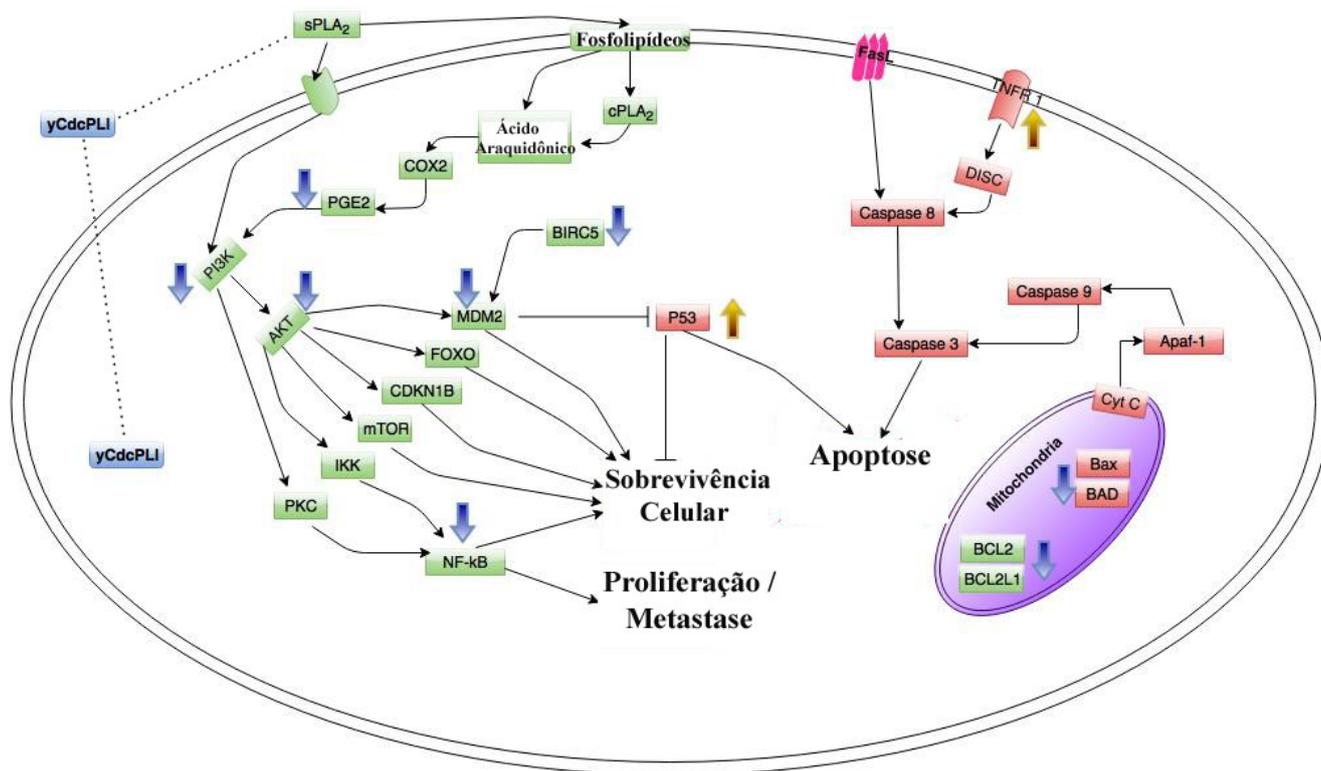


Figura 26: Modelo representativo de algumas vias de sinalização em células de câncer de mama (MDA-MB-231) que podem ser moduladas pelo inibidor de PLA₂ γCdcPLI. Sendo que os quadrados em verde significam genes e/ou proteínas envolvidos com as vias de sobrevivência celular; enquanto que os quadrados em vermelho significam genes e/ou proteínas envolvidos com as vias de morte celular. O inibidor de PLA₂ foi capaz de interferir na expressão de diferentes genes e proteínas envolvidas com os processos de proliferação, metástase, sobrevivência celular e vias de apoptose. Sendo que: **PLA₂**, Fosfolipase A₂; **PGE₂**, prostaglandina E₂; **COX**, cyclooxygenase; **PI3K**, Fosfoinositol-3-kinase; **CDKN1B**, Inibidor de kinase 1B dependente de ciclina; **FOXO**, forkhead box, sub-grupo O; **MDM2**, Survivina; **Apaf-1**, Peptidase ativadora de apoptose; **FasL**, Fas ligante; **TNFR1**, receptor de TNF; **PKC**, Proteína kinase C; **NF-kB**, fator nuclear de kappa; **Rec**, receptor de PLA₂; Sendo que os símbolos: —→ representa Regulação positiva; |— representa Regulação negativa e sugere os possíveis alvos do inibidor γCdcPLI; Setas azuis significam diminuição da expressão e setas alaranjadas significam expressão aumentada.

O γCdcPLI poderia iniciar diferentes respostas moleculares no interior das células, como foram demonstrados em diversos ensaios descritos neste trabalho, por exemplo a inibição da adesão celular e da angiogênese, ativação de vias apoptóticas, como via do p53, e inibição de vias de sobrevivência, como a via do PI3K/AKT, onde

PLA₂s secretórias e ou citosólicas estariam envolvidas (Gottlieb *et al.*, 2002; Panel *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2008; Murakami *et al.*, 2015; Yarla *et al.*, 2016).

A identificação dos possíveis alvos nas células tumorais é importante para elucidação completa para melhor compreensão dos mecanismos de ação dessa proteína. Este trabalho abre perspectivas para aprofundar a investigação dos efeitos antitumorais do inibidor, utilizando novas abordagens *in vivo*, produção em larga escala e uso de peptídeos sintéticos derivados de sua estrutura.

6.0 Conclusão

- O inibidor γ CdcPLI isolado do soro da serpente *Crotalus durissus collilineatus* foi citotóxico sobre diferentes linhagens de células tumorais apresentando maior citotoxicidade sobre células de câncer de mama MDA-MB-231, demonstrando uma preferência por alvos nessas células tumorais quando comparado com as células de mama não tumorigênicas.
- γ CdcPLI induziu apoptose em células MDA-MB-231 e modulou a expressão de genes e proteínas relacionados a via de sinalização da apoptose. Além disso, o γ CdcPLI induziu a modulação de importantes mediadores da via de apoptose, como o p53, MAPK/ERK, BIRC5 e MDM2.
- O γ CdcPLI também inibiu eventos moleculares (adesão, migração e invasão) importantes para a metástase tumoral das células MDA-MB-23, bem como a angiogênese por modelos *in vitro* e *ex vivo*.
- O γ CdcPLI inibiu a atividade pró-inflamatória da PLA₂ BnSP-7 isolada da peçonha de serpente, o que permite correlacionar seus efeitos na inibição da via de sinalização da PI3K/AKT nas células MDA-MB-231 à uma possível interação com PLA₂s endógenas nestas células.

- Assim, demonstramos o potencial do γ CdcPLI para compreensão do mecanismo de ação de PLA₂s no câncer de mama e seu uso como modelo farmacológico para terapia antitumoral.

Referências

ABU, N. et al. Flavokawain B induced cytotoxicity in two breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB231 and inhibited the metastatic potential of MDA-MB231 via the regulation of several tyrosine kinases In vitro. **BMC Complement Altern Med**, v. 16, p. 86, 2016. ISSN 1472-6882 (Electronic)

1472-6882 (Linking).

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. ISSN 0100-4042. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000100021&nrm=iso>.

AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med**, v. 3, n. 8, p. 917-21, Aug 1997. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking).

ANFOSSO, F. et al. Outside-in signaling pathway linked to CD146 engagement in human endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 2, p. 1564-9, Jan 12 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

ANGELO J. MAGRO, A. M. S., JOSÉ R. GIGLIO AND MARCOS R. M. FONTES. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two

Lys49-phospholipases A2: quaternary structure

and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, p. 713-720, 2003.

ARRUDA MACEDO, J. K.; FOX, J. W.; DE SOUZA CASTRO, M. Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. **Curr Protein Pept Sci**, v. 16, n. 6, p. 532-48, 2015. ISSN 1389-2037.

BAKER, S. J. et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. **Science**, v. 244, n. 4901, p. 217-21, Apr 14 1989. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking).

BAKER, S. J. et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. **Science**, v. 249, n. 4971, p. 912-5, Aug 24 1990. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking).

BALOGUN, O. D.; FORMENTI, S. C. Locally advanced breast cancer - strategies for developing nations. **Front Oncol**, v. 5, p. 89, 2015. ISSN 2234-943X (Electronic)

2234-943X (Linking).

BARRETT, J. C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. **Environ Health Perspect**, v. 100, p. 9-20, Apr 1993. ISSN 0091-6765 (Print)

0091-6765.

BAZAA, A. et al. MVL-PLA2, a snake venom phospholipase A2, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10124, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20405031> >.

BISCHOFF, J. Cell adhesion and angiogenesis. **J Clin Invest**, v. 99, n. 3, p. 373-6, Feb 1 1997. ISSN 0021-9738 (Print).

BOGDANOVA, N.; HELBIG, S.; DORK, T. Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle. **Hered Cancer Clin Pract**, v. 11, n. 1, p. 12, Sep 11 2013. ISSN 1731-2302 (Print)

1731-2302.

BOHL, C. R. et al. Metastasis suppressors in breast cancers: mechanistic insights and clinical potential. **J Mol Med (Berl)**, v. 92, n. 1, p. 13-30, Jan 2014. ISSN 0946-2716.

BONVENTRE, J. V. et al. Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. **Nature**, v. 390, n. 6660, p. 622-5, Dec 11 1997. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836.

BORNER, M. M. et al. Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer. **Br J Cancer**, v. 79, n. 5-6, p. 952-8, Feb 1999. ISSN 0007-0920 (Print)

0007-0920.

BOURDON, J. C. et al. Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane. **J Cell Biol**, v. 158, n. 2, p. 235-46, Jul 22 2002. ISSN 0021-9525 (Print)

0021-9525 (Linking).

BOYD, J. Genetic predisposition to breast cancer: the next chapters. **Cancer**, v. 120, n. 7, p. 932-4, Apr 01 2014. ISSN 0008-543x.

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, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697 (Linking).

BRGLEZ, V.; LAMBEAU, G.; PETAN, T. Secreted phospholipases A2 in cancer: diverse mechanisms of action. **Biochimie**, v. 107 Pt A, p. 114-23, Dec 2014. ISSN 1638-6183 (Electronic)

0300-9084 (Linking).

BRGLEZ, V. et al. Secreted phospholipases A(2) are differentially expressed and epigenetically silenced in human breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 445, n. 1, p. 230-5, Feb 28 2014. ISSN 1090-2104 (Electronic)

0006-291X (Linking).

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 23, n. 1, p. 49-59, Feb 2009. ISSN 1573-7241 (Electronic)

0920-3206 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931897> >.

BUSSOLINO, F. et al. Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. **J Immunol**, v. 147, n. 7, p. 2122-9, Oct 1 1991. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking).

CARDONE, M. H. et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, v. 282, n. 5392, p. 1318-21, Nov 13 1998. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking).

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249-57, Sep 14 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836.

CASTANEDA-GILL, J. M.; VISHWANATHA, J. K. Antiangiogenic mechanisms and factors in breast cancer treatment. **J Carcinog**, v. 15, p. 1, 2016. ISSN 1477-3163 (Print)

1477-3163.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118-32, Feb 2004. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175x.

CESCA, M. et al. Tumor delivery of chemotherapy combined with inhibitors of angiogenesis and vascular targeting agents. **Front Oncol**, v. 3, p. 259, Oct 01 2013. ISSN 2234-943X (Print)
2234-943x.

CHOW, N. H. et al. Expression of fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 in normal liver and hepatocellular carcinoma. **Dig Dis Sci**, v. 43, n. 10, p. 2261-6, Oct 1998. ISSN 0163-2116 (Print)
0163-2116 (Linking).

COLEMAN, R. E.; RUBENS, R. D. The clinical course of bone metastases from breast cancer. **Br J Cancer**, v. 55, n. 1, p. 61-6, Jan 1987. ISSN 0007-0920 (Print)
0007-0920.

CUMMINGS, B. S. Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 7, p. 949-59, Oct 1 2007. ISSN 0006-2952 (Print)
0006-2952 (Linking).

CUMMINGS, B. S.; MCHOWAT, J.; SCHNELLMANN, R. G. Phospholipase A(2)s in cell injury and death. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 294, n. 3, p. 793-9, Sep 2000. ISSN 0022-3565 (Print)
0022-3565 (Linking).

DE HAAS, G. H. et al. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochim Biophys Acta**, v. 159, n. 1, p. 103-17, Apr 24 1968. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J Biol Chem**, v. 269, n. 18, p. 13057-60, May 6 1994. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking).

DHILLON, A. S. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279-90, May 14 2007. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking).

DILLON, R. L.; WHITE, D. E.; MULLER, W. J. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1338-45, Feb 26 2007. ISSN 0950-9232 (Print)
0950-9232 (Linking).

DOMONT, G. B.; PERALES, J.; MOUSSATCHE, H. Natural anti-snake venom proteins. **Toxicon**, v. 29, n. 10, p. 1183-94, 1991. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking).

DONNINI, S. et al. A novel protein from the serum of Python sebae, structurally homologous with type-gamma phospholipase A(2) inhibitor, displays antitumour activity. **Biochem J**, v. 440, n. 2, p. 251-62, Dec 1 2011. ISSN 1470-8728 (Electronic)

0264-6021 (Linking).

DUNN, R. D.; BROADY, K. W. Snake inhibitors of phospholipase A(2) enzymes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1533, n. 1, p. 29-37, Aug 29 2001. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking).

EISEN, M. B.; BROWN, P. O. DNA arrays for analysis of gene expression. **Methods Enzymol**, v. 303, p. 179-205, 1999. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879.

EL-MAHDY, M. A. et al. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. **Int J Cancer**, v. 117, n. 3, p. 409-17, Nov 10 2005. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136 (Linking).

ELENBAAS, B. et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. **Genes Dev**, v. 15, n. 1, p. 50-65, Jan 01 2001. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007. ISSN 0192-6233 (Print)

0192-6233 (Linking).

ESTEVAO-COSTA, M. I. et al. Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous gamma-phospholipase A(2) inhibitors in Brazilian Bothrops snakes (Viperidae, Crotalinae). **Toxicon**, v. 52, n. 1, p. 122-9, Jul 2008. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18620721> >.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A(2). **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 833-40, Sep-Oct 2000. ISSN 0300-9084 (Print)

0300-9084 (Linking).

FELDING-HABERMANN, B. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. **Clin Exp Metastasis**, v. 20, n. 3, p. 203-13, 2003. ISSN 0262-0898 (Print)

0262-0898 (Linking). Disponível em: < http://download.springer.com/static/pdf/663/art%253A10.1023%252FA%253A1022983000355.pdf?auth66=1402759468_14a23ee7c44a6f1ae9697a366b579df9&ext=.pdf >.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 1 2015. ISSN 1097-0215 (Electronic)

0020-7136 (Linking).

FERREIRA, F. B. et al. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA2 from Bothrops pauloensis snake venom. **Toxins (Basel)**, v. 5, n. 12, p. 2403-19, Dec 2013. ISSN 2072-6651 (Electronic)

2072-6651 (Linking). Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2072-6651/5/12/2403/pdf> >.

FINLAY, C. A.; HINDS, P. W.; LEVINE, A. J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell**, v. 57, n. 7, p. 1083-93, Jun 30 1989. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking).

FITZPATRICK, T. E. et al. Inhibition of breast carcinoma and trophoblast cell invasiveness by vascular endothelial growth factor. **Exp Cell Res**, v. 283, n. 2, p. 247-55, Feb 15 2003. ISSN 0014-4827 (Print)

0014-4827.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Med**, v. 1, n. 1, p. 27-31, Jan 1995. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956.

_____. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Semin Oncol**, v. 29, n. 6 Suppl 16, p. 15-8, Dec 2002. ISSN 0093-7754 (Print)

0093-7754 (Linking).

FOLKMAN, J.; D'AMORE, P. A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell**, v. 87, n. 7, p. 1153-5, Dec 27 1996. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking).

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J Biol Chem**, v. 267, n. 16, p. 10931-4, Jun 5 1992. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking).

FORTES-DIAS, C. L. Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 8, p. 997-1008, 1991.

_____. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A2 inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Interaction with PLA2 from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v. 37, p. 1747-1759, 1999.

FORTES-DIAS, C. L.; BARCELLOS, C. J.; ESTEVÃO-COSTA, M. I. Molecular cloning of a γ -phospholipase A2 inhibitor from *Lachesis muta muta* (the bushmaster snake). **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 909-917, 2003. ISSN 00410101.

FORTES-DIAS, C. L. et al. A phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. **J Biol Chem**, v. 269, n. 22, p. 15646-51, Jun 03 1994. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258.

FORTES-DIAS, C. L. et al. Insights on the structure of native CNF, an endogenous phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus terrificus*, the South American rattlesnake. **Biochim Biophys Acta**, v. 1844, n. 9, p. 1569-79, Sep 2014. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

FRAME, F. M. et al. Mechanisms of growth inhibition of primary prostate epithelial cells following gamma irradiation or photodynamic therapy include senescence, necrosis, and autophagy, but not apoptosis. **Cancer Med**, v. 5, n. 1, p. 61-73, Jan 2016. ISSN 2045-7634.

FREMONT, D. H. et al. Crystal structure of phospholipase A2 from Indian cobra reveals a trimeric association. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 1, p. 342-6, Jan 01 1993. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 107-20, Jan 2012. ISSN 1350-9047.

GARCIA DENEGRI, M. E. et al. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, v. 56, n. 1, p. 64-74, Aug 1 2010. ISSN 1879-3150 (Electronic)

0041-0101 (Linking).

GIMENES, S. N. et al. Isolation and biochemical characterization of a gamma-type phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **Toxicon**, v. 81, p. 58-66, Apr 2014. ISSN 1879-3150 (Electronic)

0041-0101 (Linking).

GOTTLIEB, T. M. et al. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. **Oncogene**, v. 21, n. 8, p. 1299-303, Feb 14 2002. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232.

GRIZZI, F. et al. Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. **BMC Cancer**, v. 5, p. 14, Feb 08 2005. ISSN 1471-2407.

GROSE, R.; DICKSON, C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 2, p. 179-86, Apr 2005. ISSN 1359-6101 (Print)

1359-6101.

GUO, W.; GIANCOTTI, F. G. Integrin signalling during tumour progression. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 10, p. 816-26, Oct 2004. ISSN 1471-0072 (Print)

1471-0072 (Linking).

GUPTA, D. et al. Effect of overexpression and nuclear translocation of constitutively active PKB-alpha on cellular survival and proliferation in HepG2 cells. **J Cell Biochem**, v. 93, n. 3, p. 513-25, Oct 15 2004. ISSN 0730-2312 (Print)

0730-2312 (Linking).

GUPTA, G. P.; MASSAGUE, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-95, Nov 17 2006. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 04 2011. ISSN 0092-8674.

HEATH, V. L.; BICKNELL, R. Anticancer strategies involving the vasculature. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 6, n. 7, p. 395-404, Jul 2009. ISSN 1759-4774.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-6, Oct 12 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836.

HERNANDEZ, M. et al. Secreted PLA2 induces proliferation in astrocytoma through the EGF receptor: another inflammation-cancer link. **Neuro Oncol**, v. 12, n. 10, p. 1014-23, Oct 2010. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking).

HIRSCHI, K. K.; D'AMORE, P. A. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovasc Res**, v. 32, n. 4, p. 687-98, Oct 1996. ISSN 0008-6363 (Print)

0008-6363 (Linking).

HOLLSTEIN, M. et al. New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. **Mutat Res**, v. 431, n. 2, p. 199-209, Dec 17 1999. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107 (Linking).

HOSNY, M. M. et al. Promoter Methylation Status of Breast Cancer Susceptibility Gene 1 and 17 Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Gene in Sporadic Breast Cancer Patients. **Int J Breast Cancer**, v. 2016, p. 9545241, 2016. ISSN 2090-3170 (Print)

2090-3189.

HSIA, S. M. et al. Isoliquiritigenin as a cause of DNA damage and inhibitor of ataxia-telangiectasia mutated expression leading to G2/M phase arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**, Jan 10 2015. ISSN 1097-0347 (Electronic)

1043-3074 (Linking).

HU, M. et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. **Cancer Cell**, v. 13, n. 5, p. 394-406, May 2008. ISSN 1535-6108.

HUNTER, K. W. Host genetics and tumour metastasis. **Br J Cancer**, v. 90, n. 4, p. 752-5, Feb 23 2004. ISSN 0007-0920 (Print)

1532-1827 (Electronic).

HUNTER, K. W.; CRAWFORD, N. P.; ALSARRAJ, J. Mechanisms of metastasis. **Breast Cancer Res**, v. 10 Suppl 1, p. S2, 2008. ISSN 1465-542X (Electronic)

1465-5411 (Linking).

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. **Cancer Res**, v. 58, n. 18, p. 4023-37, Sep 15 1998. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking).

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673-87, Sep 20 2002. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking).

INDRAN, I. R. et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1807, n. 6, p. 735-45, Jun 2011. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

INOUE, S. et al. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. **J Biol Chem**, v. 266, n. 2, p. 1001-7, Jan 15 1991. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking).

JEBALI, J. et al. Lebecin, a new C-type lectin like protein from *Macrovipera lebetina* venom with anti-tumor activity against the breast cancer cell line MDA-MB231. **Toxicon**, v. 86, p. 16-27, Aug 2014. ISSN 0041-0101.

JUNG, M. et al. Mast Cells Produce Novel Shorter Forms of Perlecan That Contain Functional Endorepellin: A ROLE IN ANGIOGENESIS AND WOUND HEALING. **The Journal of Biological Chemistry**, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814, U.S.A., v. 288, n. 5, p. 3289-3304, 12/12

06/01/received

11/30/revised 2013. ISSN 0021-9258

1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3561549/> >.

KAMAL, A. et al. Benzo[b]furan derivatives induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human breast cancer cells. **Bioorg Chem**, v. 66, p. 124-31, Jun 2016. ISSN 1090-2120 (Electronic)

0045-2068 (Linking).

KAO, K. J. et al. Correlation of microarray-based breast cancer molecular subtypes and clinical outcomes: implications for treatment optimization. **BMC Cancer**, v. 11, p. 143, Apr 18 2011. ISSN 1471-2407.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972. ISSN 0007-0920 (Print)

0007-0920.

KIHARA, H. Studies on phospholipase A in Trimeresurus flaviviridis venom. III. Purification and some properties of phospholipase A inhibitor in Habu serum. **J Biochem**, v. 80, n. 2, p. 341-9, Aug 1976. ISSN 0021-924X (Print)

0021-924X (Linking).

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613-35, 1989. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

KLAUS, A.; BIRCHMEIER, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 5, p. 387-98, May 2008. ISSN 1474-175x.

KNIZHNIK, A. V. et al. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55665, 2013. ISSN 1932-6203.

KUMAR, R. et al. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. **Int J Oncol**, v. 12, n. 4, p. 749-57, Apr 1998. ISSN 1019-6439 (Print)

1019-6439.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.nature.com/nature/journal/v227/n5259/abs/227680a0.html>>.

LANDUCCI, E. C. et al. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 3, p. 578-83, Feb 1995. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188.

LESLIE, C. C. Cytosolic phospholipase A(2): physiological function and role in disease. **J Lipid Res**, v. 56, n. 8, p. 1386-402, Aug 2015. ISSN 0022-2275.

LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479-89, Nov 14 1997. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674.

LI, Y. et al. Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of PI3K/Akt in human breast cancer. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 272, n. 1, p. 37-48, Oct 1 2013. ISSN 1096-0333 (Electronic)

0041-008X (Linking).

LIZANO, S. et al. Two phospholipase A2 inhibitors from the plasma of Cerrophidion (Bothrops) godmani which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochem J**, v. 346 Pt 3, p. 631-9, Mar 15 2000. ISSN 0264-6021 (Print)

0264-6021 (Linking).

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 963-77, Dec 15 2003. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking).

LIZANO, S. D., G.; PERALES, J. Natural phospholipase A2 myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, p. 963-977, 2003.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487-501, Feb 23 2001. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking).

LOUREIRO, R. M.; D'AMORE, P. A. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 1, p. 77-89, Feb 2005. ISSN 1359-6101 (Print)

1359-6101.

LOWE, S. W. et al. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. **Cell**, v. 74, n. 6, p. 957-67, Sep 24 1993. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674.

MAJDALAWIEH, A. F.; FAYYAD, M. W.; NASRALLAH, G. K. Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*. **Crit Rev Food Sci Nutr**, p. 0, Jan 31 2017. ISSN 1040-8398.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am J Pathol**, v. 146, n. 1, p. 3-15, Jan 1995. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440.

MAJUMDER, M. et al. COX-2 Induces Breast Cancer Stem Cells via EP4/PI3K/AKT/NOTCH/WNT Axis. **Stem Cells**, Jun 14 2016. ISSN 1549-4918 (Electronic)

1066-5099 (Linking).

MANNELLO, F. et al. Nipple aspirate fluids from women with breast cancer contain increased levels of group IIa secretory phospholipase A2. **Breast Cancer Res Treat**, v. 111, n. 2, p. 209-18, Sep 2008. ISSN 0167-6806 (Print)

0167-6806 (Linking).

MARGAN, M. M. et al. Molecular Portrait of the Normal Human Breast Tissue and Its Influence on Breast Carcinogenesis. **J Breast Cancer**, v. 19, n. 2, p. 99-111, Jun 2016. ISSN 1738-6756 (Print)

1738-6756.

MARUSAWA, H. et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. **Embo j**, v. 22, n. 11, p. 2729-40, Jun 02 2003. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189.

MIYAMOTO, M. et al. High-temperature-required protein A2 as a predictive marker for response to chemotherapy and prognosis in patients with high-grade serous ovarian cancers. **Br J Cancer**, v. 116, n. 6, p. e2, Mar 14 2017. ISSN 0007-0920.

MOHANKUMAR, K. et al. Mechanism of apoptotic induction in human breast cancer cell, MCF-7, by an analog of curcumin in comparison with curcumin--an in vitro and in silico approach. **Chem Biol Interact**, v. 210, p. 51-63, Mar 5 2014. ISSN 1872-7786 (Electronic)

0009-2797 (Linking).

MONTASSAR, F. et al. Lebecetin, a C-type lectin, inhibits choroidal and retinal neovascularization. **Faseb j**, Dec 14 2016. ISSN 0892-6638.

MURAKAMI, M. et al. A new era of secreted phospholipase A(2). **J Lipid Res**, v. 56, n. 7, p. 1248-61, Jul 2015. ISSN 0022-2275.

NAGASE, T. et al. Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A2. **Nat Immunol**, v. 1, n. 1, p. 42-6, Jul 2000. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908.

NICOSIA, R. F.; BONANNO, E.; VILLASCHI, S. Large-vessel endothelium switches to a microvascular phenotype during angiogenesis in collagen gel culture of rat aorta. **Atherosclerosis**, v. 95, n. 2-3, p. 191-9, Aug 1992. ISSN 0021-9150 (Print)

0021-9150.

NISHIDA, N. et al. Angiogenesis in Cancer. **Vasc Health Risk Manag**, v. 2, n. 3, p. 213-9, Sep 2006. ISSN 1176-6344 (Print)

1178-2048 (Electronic).

NOUBISSI, F. K. et al. Apoptosis-induced cancer cell fusion: a mechanism of breast cancer metastasis. **FASEB J**, Jun 17 2015. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking).

NUNES, T.; BERNARDAZZI, C. Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium. v. 2014, p. 218493, 2014.

OCANA, A. et al. Addition of bevacizumab to chemotherapy for treatment of solid tumors: similar results but different conclusions. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 3, p. 254-6, Jan 20 2011. ISSN 0732-183x.

OHKURA, N. et al. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of the sea krait, *Laticauda semifasciata*. **J Biochem**, v. 125, n. 2, p. 375-82, Feb 1999. ISSN 0021-924X (Print)

0021-924X (Linking).

OKUMURA, K. et al. Identification of beta-type phospholipase A(2) inhibitor in a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. **Arch Biochem Biophys**, v. 408, n. 1, p. 124-30, Dec 01 2002. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861.

OKUMURA, K. et al. A novel phospholipase A2 inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. Sequence homologies with human leucine-rich alpha2-glycoprotein. **J Biol Chem**, v. 273, n. 31, p. 19469-75, Jul 31 1998. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking).

OLINER, J. D. et al. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 80-3, Jul 2 1992. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking).

OLIVEIRA, C. F. et al. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from Bothrops (neuwiedii) pauloensis snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 5, p. 560-9, Apr 2009. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking).

OLIVEIRA, C. Z. et al. An alpha-type phospholipase A(2) inhibitor from Bothrops jararacussu snake plasma: structural and functional characterization. **Biochimie**, v. 90, n. 10, p. 1506-14, Oct 2008. ISSN 0300-9084 (Print)

0300-9084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18549822> >.

OLIVEIRA, C. Z. et al. Structural and functional characterization of a gamma-type phospholipase A2 inhibitor from bothrops jararacussu snake plasma. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 20, p. 2509-19, 2011. ISSN 1873-4294 (Electronic)

1568-0266 (Linking).

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol**, v. 2, n. 3, p. REVIEWS3005, 2001. ISSN 1465-6914 (Electronic)

1465-6906 (Linking).

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif**, v. 45, n. 6, p. 487-98, Dec 2012. ISSN 0960-7722.

OVADIA, M.; KOCHVA, E. Neutralization of Viperidae and Elapidae snake venoms by sera of different animals. **Toxicon**, v. 15, n. 6, p. 541-7, 1977. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking).

PANEL, V. et al. Cytoplasmic phospholipase A2 expression in human colon adenocarcinoma is correlated with cyclooxygenase-2 expression and contributes to prostaglandin E2 production. **Cancer Lett**, v. 243, n. 2, p. 255-63, Nov 18 2006. ISSN 0304-3835 (Print)

0304-3835.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 282, n. 5, p. C947-70, May 2002. ISSN 0363-6143 (Print)

0363-6143.

PATEL, M. I. et al. Cytosolic phospholipase A2-alpha: a potential therapeutic target for prostate cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 24, p. 8070-9, Dec 15 2008. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432.

PATEL, V. A. et al. Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: Implications for the delayed clearance model of autoimmunity. **J Biol Chem**, v. 281, n. 8, p. 4663-70, Feb 24 2006. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking).

PENG, F. et al. A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin. **Phytother Res**, v. 29, n. 7, p. 969-77, Jul 2015. ISSN 1099-1573 (Electronic)
0951-418X (Linking).

PERALES, J. et al. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **Eur J Biochem**, v. 227, n. 1-2, p. 19-26, Jan 15 1995. ISSN 0014-2956 (Print)
0014-2956.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug 17 2000. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836.

PHADKE, P. A. et al. BRMS1 suppresses breast cancer experimental metastasis to multiple organs by inhibiting several steps of the metastatic process. **Am J Pathol**, v. 172, n. 3, p. 809-17, Mar 2008. ISSN 0002-9440 (Print)
0002-9440.

PICELLI, C. G. et al. Molecular cloning and structural modelling of gamma-phospholipase A2 inhibitors from *Bothrops atrox* and *Micrurus lemniscatus* snakes. **Int J Biol Macromol**, v. 103, p. 525-532, May 18 2017. ISSN 0141-8130.

PIEROTTI, M. A.; SOZZI, G.; CROCE, C. M. *Oncogenes*. 2003.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **J Clin Invest**, v. 117, n. 11, p. 3155-63, Nov 2007. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking).

PRESTA, M. et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 2, p. 159-78, Apr 2005. ISSN 1359-6101 (Print)

1359-6101.

PUCER, A. et al. Group X secreted phospholipase A(2) induces lipid droplet formation and prolongs breast cancer cell survival. **Molecular Cancer**, v. 12, p. 111-111, 09/27

07/04/received

09/24/accepted 2013. ISSN 1476-4598. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3852912/>>.

RELF, M. et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. **Cancer Res**, v. 57, n. 5, p. 963-9, Mar 01 1997. ISSN 0008-5472

RUDDON, R. W. Introduction to the molecular biology of cancer: translation to the clinic. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 95, p. 1-8, 2010. ISSN 1877-1173.

RUSSNES, H. G. et al. Breast cancer molecular stratification- from intrinsic subtypes to integrative clusters. **Am J Pathol**, Jul 18 2017. ISSN 0002-9440.

SAELEN, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861-74, Apr 12 2004. ISSN 0950-9232

SAFDARI, Y. et al. Natural inhibitors of PI3K/AKT signaling in breast cancer: emphasis on newly-discovered molecular mechanisms of action. **Pharmacol Res**, v. 93, p. 1-10, Mar 2015. ISSN 1043-6618.

SARRIO, D. et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. **Cancer Res**, v. 68, n. 4, p. 989-97, Feb 15 2008. ISSN 0008-5472.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-59, Nov 2006. ISSN 0006-3002.

SCOTT, D. L. et al. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1541-6, Dec 14 1990. ISSN 0036-8075.

SEGELKE, B. W. et al. Structures of two novel crystal forms of *Naja naja naja* phospholipase A2 lacking Ca²⁺ reveal trimeric packing. **J Mol Biol**, v. 279, n. 1, p. 223-32, May 29 1998. ISSN 0022-2836

SEGUIN, L. et al. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. **Trends Cell Biol**, v. 25, n. 4, p. 234-40, Apr 2015. ISSN 0962-8924.

SERRANO, R.; THEODORO, T. R.; DA SILVA PINHAL, M. A. Oncogenes, genes supressores de tumores, microRNAs e o desenvolvimento de tumores. **RBM rev. bras. med**, v. 71, n. esp. a2, 2014. ISSN 0034-7264.

SHENG, H. et al. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 21, p. 18075-81, May 25 2001. ISSN 0021-9258

SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 14, n. 10, p. 611-629, Oct 2017. ISSN 1759-4774.

SHIMIZU, M. et al. A newly synthesized compound, 4'-geranyloxyferulic acid-N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester suppresses inflammation-associated colorectal carcinogenesis in male mice. **Int J Cancer**, v. 135, n. 4, p. 774-84, Aug 15 2014. ISSN 0020-7136.

SHIRAI, R. et al. Identification and characterization of phospholipase A2 inhibitors from the serum of the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 685-92, May 2009. ISSN 0041-0101.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2014. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21208> >.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7-30, Jan-Feb 2016. ISSN 1542-4863

SISCI, D. et al. 17beta-estradiol enhances alpha(5) integrin subunit gene expression through ERalpha-Sp1 interaction and reduces cell motility and invasion of ERalpha-positive breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**, v. 124, n. 1, p. 63-77, Nov 2010. ISSN 0167-6806.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 1-19, Oct 31 2000. ISSN 0006-3002

SLATTERY, M. L. et al. Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: The Breast Cancer Health Disparities

Study. **Breast cancer research and treatment**, v. 140, n. 3, p. 587-601, 08/03 2013. ISSN 0167-6806

1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3860319/> >.

SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. **J Biol Chem**, v. 276, n. 10, p. 7320-6, Mar 9 2001. ISSN 0021-9258

SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from Bothrops neuwiedi pauloensis venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, n. 2, p. 201-9, Jun 15 2000. ISSN 0003-9861

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, Sep 11 2001. ISSN 0027-8424

SORLIE, T. et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, v. 7, p. 127, May 26 2006. ISSN 1471-2164.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Res**, v. 70, n. 14, p. 5649-69, Jul 15 2010. ISSN 0008-5472.

TANAKA, T. et al. Chemical-induced carcinogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 203-209, 2013. ISSN 1878-3317.

TAO, Z. et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 72, n. 2, p. 333-338, June 01 2015. ISSN 1559-0283. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>

<http://dx.doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6> >.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1456-62, Mar 10 1995. ISSN 0036-8075

THWIN, M. M. et al. Recombinant antitoxic and antiinflammatory factor from the nonvenomous snake Python reticulatus: phospholipase A2 inhibition and venom neutralizing potential. **Biochemistry**, v. 39, n. 31, p. 9604-11, Aug 8 2000. ISSN 0006-2960

THWIN, M. M. et al. Functional site of endogenous phospholipase A2 inhibitor from python serum. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 2, p. 719-27, Jan 2002. ISSN 0014-2956

TOMAO, F. et al. Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. **Onco Targets Ther**, v. 8, p. 177-93, 2015. ISSN 1178-6930

TOULANY, M.; RODEMANN, H. P. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling as a key mediator of tumor cell responsiveness to radiation. **Semin Cancer Biol**, Jul 17 2015. ISSN 1096-3650

TRUMP, B. F. et al. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicol Pathol**, v. 25, n. 1, p. 82-8, Jan-Feb 1997. ISSN 0192-6233

TUORKEY, M. J. Curcumin a potent cancer preventive agent: Mechanisms of cancer cell killing. **Interv Med Appl Sci**, v. 6, n. 4, p. 139-46, Dec 2014. ISSN 2061-1617

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-92, Oct 14 2011. ISSN 0092-8674.

VASILAKAKI, S. et al. Inhibitors of secreted phospholipase A2 suppress the release of PGE2 in renal mesangial cells. **Bioorg Med Chem**, v. 24, n. 13, p. 3029-34, Jul 01 2016. ISSN 0968-0896.

VINCENT, T. L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **Int J Oncol**, v. 32, n. 4, p. 729-37, Apr 2008. ISSN 1019-6439

VOSS, M. J. et al. Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia, mediated by an autocrine mechanism. **BMC Cancer**, v. 11, p. 158, May 02 2011. ISSN 1471-2407.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Measurement of eicosanoids in cancer tissues. **Methods Enzymol**, v. 433, p. 27-50, 2007. ISSN 0076-6879

WANG, Z.; FUKUDA, S.; PELUS, L. M. Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. **Oncogene**, v. 23, n. 49, p. 8146-53, Oct 21 2004. ISSN 0950-9232

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 351-360, 2002. ISSN 0004-2730. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302002000400006&nrm=iso>.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. alphaV integrins in angiogenesis and cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, p. a006478, Sep 2011. ISSN 2157-1422.

WHITE, S. P. et al. Crystal structure of cobra-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1560-3, Dec 14 1990. ISSN 0036-8075

WILLIAMS, M. M.; COOK, R. S. Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3519-30, Feb 28 2015. ISSN 1949-2553.

WLODKOWIC, D. et al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods Cell Biol**, v. 103, p. 55-98, 2011. ISSN 0091-679X

XIONG, J.; BALCIOGLU, H. E.; DANEN, E. H. Integrin signaling in control of tumor growth and progression. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 5, p. 1012-5, May 2013. ISSN 1878-5875

YAMASHITA, S.; YAMASHITA, J.; OGAWA, M. Overexpression of group II phospholipase A2 in human breast cancer tissues is closely associated with their malignant potency. **Br J Cancer**, v. 69, n. 6, p. 1166-70, Jun 1994. ISSN 0007-0920

YANG, J. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. **Cell**, v. 117, n. 7, p. 927-39, Jun 25 2004. ISSN 0092-8674

YARLA, N. S. et al. Phospholipase A2 Isoforms as Novel Targets for Prevention and Treatment of Inflammatory and Oncologic Diseases. **Curr Drug Targets**, v. 17, n. 16, p. 1940-1962, 2016. ISSN 1389-4501.

ZABOUO, G. et al. CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. **Breast Cancer Res**, v. 11, n. 1, p. R1, 2009. ISSN 1465-5411.

ZHU, C. et al. PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways are involved in IGF-1-induced VEGF-C upregulation in breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 137, n. 11, p. 1587-94, Nov 2011. ISSN 1432-1335

ZIPPEL, N.; DING, Y.; FLEMING, I. A Modified Aortic Ring Assay to Assess Angiogenic Potential In Vitro. **Methods Mol Biol**, v. 1430, p. 205-19, 2016. ISSN 1064-3745.

