

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DM43, UM INIBIDOR DE METALOPROTEASES DE
MATRIZ ENVOLVIDAS EM OSTEOARTRITE E
NEOPLASIAS

Patrícia Barbosa Jurgilas

RIO DE JANEIRO
OUTUBRO DE 2004

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

DM43, UM INIBIDOR DE METALOPROTEASES DE
MATRIZ ENVOLVIDAS EM OSTEOARTRITE E
NEOPLASIAS

Tese submetida ao curso
de Pós-graduação em
Biologia Celular e Molecular
da Fundação Oswaldo Cruz,
visando a obtenção do grau
de Doutor em Ciências.

Rio de Janeiro
Outubro de 2004

Ministério da Saúde

Jurgilas, P.B.

DM43, um inibidor de metaloproteases de matriz envolvidas em osteoartrite e neoplasias

Rio de Janeiro, FIOCRUZ, Departamento de Fisiologia e Farmacocinâmica, 2004.

Tese: Doutorado em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

1. Inibidores de metaloproteases; 2. Metaloproteases de matriz;
3. Neoplasias e Osteoartrite.

I. Instituto Oswaldo Cruz

II. Título

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

DM43, UM INIBIDOR DE METALOPROTEASES DE
MATRIZ ENVOLVIDAS EM OSTEOARTRITE E
NEOPLASIAS

Orientadores: Dr. Jonas Perales
Dr. Gilberto Domont

Patrícia Barbosa Jurgilas

Rio de Janeiro
Outubro de 2004

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

DM43, UM INIBIDOR DE METALOPROTEASES DE
MATRIZ ENVOLVIDAS EM OSTEOARTRITE E
NEOPLASIAS

Patrícia Barbosa Jurgilas
Orientadores: Dr. Jonas Perales
Dr. Gilberto Domont

Banca Examinadora:

Dra. Verônica Morandi – Lab. de Biologia da Célula Endotelial e da
Angiogênese- UERJ.

Dra. Vivian Mary B. Dodd Rumjanek-Lab. Imunologia Tumoral- UFRJ.
Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto- Lab.Imunofarmacologia- DFF/IOC-
FIOCRUZ.

Suplentes:

Dra. Ana Gisele da Costa Neves-Ferreira – Lab. Toxinologia-DFF/IOC-
FIOCRUZ.

Dra. Patrícia Machado Rodrigues da Silva Martins- Lab. Inflamação-DFF/IOC-
FIOCRUZ.

Rio de Janeiro
Outubro 2004

“... Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

(Cora Coralina)

A todas as pessoas que acreditaram...

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Haity Moussatché (In memorian) que me deu a oportunidade de ingressar no laboratório de Toxinologia, e compartilhar do seu exemplo de dedicação à ciência.

Ao Dr. Jonas Perales que mais que um orientador, nos faz sentir “filhas” com a confiança e carinho que dirige o laboratório.

À Dra. Ana Gisele C. Neves-Ferreira que mais uma vez colaborou em todas as etapas com seu olhar científico.

Ao Dr. Gilberto Domont pelas ótimas sugestões e por provar que as coisas mudam...

Ao Dr. Wilson Savino que abriu as portas de seu laboratório. Obrigada pela visão.

À Juliana de Meis que mais do que uma grande amiga, é a minha “irmã de vida” me incentivando e confiando no meu trabalho durante todo o tempo. Sem ela nada disso seria uma possível...

À Daniela e ao Désio, que sempre me apoiaram e foram incansáveis e indispensáveis em todas as etapas desta tese.

À Surza, Simone, Willian, Monique, Richard, Lidiane, Kelen, Frank, Henk e Ileana que tornam o dia-a-dia no laboratório um prazer.

À minha sempre amiga Ana Tereza, que está ao meu lado nos melhores e piores momentos há 20 anos...

Aos meus pais, por existirem....

Ao Daniel, que com sua paz e bom humor, me ensinou a ser muito mais feliz .

Ao Léo, que por motivos óbvios, nos lembra como é bom, às vezes, ser criança.

À Clara , Blanca e ao Sam que me deram carinhos e companhias incondicionais.

À Deus..... por tudo.

LISTA DE ABREVIÇÕES

Abs- Absorbância

ADAM- proteína de superfície celular contendo domínios tipo-metaloprotease e tipo-desintegrina

ADAM-TS- proteína de superfície celular contendo domínios tipo-metaloprotease e tipo-desintegrina com com domínio trombospondina

APMA- acetato de aminophenil mercúrico

BSA- soro albumina bovina

COX-()- ciclooxigenase- ()

DEAE- dietilaminoetil

DM- *Didelphis marsupialis*

DMEM- meio essencial mínimo Dubecco

DNA- ácido desoxirribonucléico

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

EGF- fator de crescimento epidermal

FAB – fração antibotrópica

FAS- receptor de morte

FITC- fluorocromos isotiocianato de fluoresceína

FGF- fator de crescimento de fibroblasto

FSC- parâmetro de tamanho

GAG- glicosaminoglicanos

HIV- vírus da imunodeficiência humana

IA- índice de adesão

IGF- fator de crescimento de insulina

IL-()- interleucina-()

INCA- Instituto Nacional do Câncer

kDa- quilodalton

MALDI-TOF – análise por espectrometria de massa por ionização a laser assistida por matriz –tempo de voo

MCF7- linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano

MDA- linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano

MDC- proteína contendo domínios metaloprotease, tipo- desintegrina e rico em cisteína

MEC-componente de matriz extracelular

MF- MMPs isoladas da linhagem celular de fibroblastos

µg- micrograma

mL- mililitro

MMLSO- MMP isoladas do líquido sinovial de pacientes com osteoartrite

MMCF7- MMP isoladas da linhagem celular de adenocarcinoma de mama

MMDA- MMP isoladas da linhagem celular de adenocarcinoma de próstata

MMP- metaloprotease de matriz

MT-MMP- metaloprotease de matriz com domínio transmembranar para ancoramento da proteína à membrana

Nk- *natural killer*

NSAID- antiinflamatórios não-esteroidais

PBS- solução de fosfato tamponada

PEX- domínio hemopexina de MMP-2

PVDF- polivinildifluoreto

RNA- ácido ribonucléico

SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil-sulfato de sódio

SSC- parâmetro de granulocidade

SVMP- metaloprotease de veneno de serpente

TACE- enzima conversora de TNF- α

TCA- ácido tricloroacético
TGF- β - fator de transformação do crescimento - beta
TIMP- inibidor tecidual de metaloprotease
TNF- α - fator de necrose tumoral - alfa
TRIS- hidroximetil-aminometano
u.m.a – unidade de massa atômica
VEGF- fator de crescimento de endotélio vascular
x g- número de vezes a aceleração da gravidade
°C- grau Celsius
3T3- linhagem celular de fibroblastos murinos
7AAD- 7-aminomicina D

ÍNDICE

Lista de figuras e tabelas	VIII
Lista de Abreviações.....	IX
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XV

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

I.1 Metaloprotease.....	1
I.1a) SVMPs.....	2
I.1b) ADAMs.....	4
I.1c) MMPs.....	6
I.2 MMPs x doenças.....	9
I.2a) Osteoartrite	9
I.2b) Câncer (neoplasias).....	11
I.3 Inibidores de metaloproteases.....	19
I.3.1) Inibidores sintéticos.....	19
I.3.2) Inibidores naturais.....	21
I.3.2a) TIMPs.....	21
I.3.2b) α_2 -macroglobulinas.....	24
I.3.2c) Inibidores isolados do soro do gambá <i>Didelphis marsupialis</i>	24
RACIONAL.....	28

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
------------------------------------	-----------

..

CAPÍTULO II: MATERIAL E MÉTODOS

II. 1 Obtenção da DM43.....	30
II.2 Obtenção das células e do líquido sinovial	31
II.3 Preparo das células e tratamento	31
II.4 Cromatografia de afinidade acoplada com DM43.....	32
II.5 Precipitação TCA.....	33
II.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	33
II.7 Zimografia	34
II.8 Imunorevelação	34
II.9 Inibição da atividade proteolítica (caseína).....	35
II.10 Inibição da atividade proteolítica (fibronectina).....	35

II.11 Marcação de componentes da matriz extracelular.....	36
II.12 Adesão celular e bloqueio.....	37
II.13 Análise do número de células.....	38
II.14 Análise do ciclo celular.....	38
II.15 Análise da morte celular.....	38

CAPÍTULO III: RESULTADOS

III.1 Cromatografia de afinidade acoplada com DM43	40
III.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
III.3 Zimografia	43
III.4 Imunorevelação	43
III.5 Inibição da atividade proteolítica (caseína).....	45
III.6 Inibição da atividade proteolítica (fibronectina).....	45
III.7 Marcação de componentes da matriz extracelular.....	48
III.8 Adesão celular e bloqueio.....	48
III.9 Análise do número de células.....	54
III.10 Análise do ciclo celular	54
III.11 Análise da morte celular	61

CAPÍTULO IV: DISCUSSÃO

DISCUSSÃO	65
CONCLUSÕES.....	78

CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS.....	79
-------------------------	-----------

ANEXO : DEPÓSITO DE PATENTE.....	92
---	-----------

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS:

Figura1: Cromatografia de afinidade acoplada com DM43.....	41
Figura 2A: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	42
Figura 2B: Zimografia.....	42
Figura 3: Imunorevelação.....	44
Figura 4: Inibição da atividade proteolítica (caseína).....	46

Figura 5A: Atividade proteolítica em fibronectina.....	47
Figura 5B: Esquema da inibição da atividade proteolítica (fibronectina).....	47
Figura 6: Marcação da MEC (fibronectina).....	49
Figura 7: Marcação da MEC (laminina).....	50
Figura 8: Marcação da MEC (colágeno IV).....	51
Figura 9: Adesão celular.....	52
Figura 10: Adesão celular e bloqueio.....	53
Figura 11: Número de células (fibroblasto).....	55
Figura 12 Número de células (MDA).....	56
Figura 13 Número de células (MCF7).....	57
Figura 14 Ciclo celular (fibroblasto).....	58
Figura 15 Ciclo celular (MDA).....	59
Figura 16 Ciclo celular (MCF7).....	60
Figura 17 Morte celular (fibroblastos).....	62
Figura 18 Morte celular (MDA).....	63
Figura 19 Morte celular (MCF7).....	64

TABELA:

Tabela I: Metaloproteases de matriz.....	8
---	---

Natural resistance of marsupials against the toxic effects of venoms is due to the presence of soluble neutralizing proteins in their sera. We have isolated from opossum serum (*Didelphis marsupialis*) an acidic glycoprotein with 43 kDa (DM43), with an effective inhibition action to metalloproteinases snake venoms, by non-covalent complex formation (Neves-Ferreira *et al.*, 2000). In this study, we have been investigating the effect of DM43 against MMPs involved in some pathologic processes, like osteoarthritis and cancer.

In order to test if DM43 is a potential inhibitor of MMPs, we submitted supernatants of stromal cells (3T3), adenocarcinoma cell line (prostate and breast) and synovial fluid from osteoarthritis to an affinity column coupled with DM43. Bound samples were analyzed on SDS-PAGE and electrotransferred to a PVDF membrane, which was incubated with anti-MMP2, anti-MMP3 or anti-MMP9 monoclonal antibodies. Positive staining was obtained.

Enzymes were inhibited by ortophenantroline and DM43, using fibronectin and casein as substrates.

Number of cells, cycle and cellular death were carried out on fibroblasts (3T3) and adenocarcinoma (MDA and MCF7) with three doses of DM43 (10, 250 e 1000ng/mL). Our results demonstrated a decrease on 3T3 and MCF7 numbers, using all these DM43 doses. Cell cycle analysis demonstrated no differences in control and DM43 treated cells. The decrease of cellularity was promoted by the increase in cellular death by an already unknown pathway. The cellular death on 3T3 and MCF7 was increased 2 and 7x respectively, compared with the control. MDA cell line was not affected by DM43 treatment.

Imunocytochemistry was carried out on 3T3 cells, which were incubated with antibodies raised against ECM (laminin, fibronectin and collagen IV) followed by FITC-conjugated goat anti-rabbit for staining procedure. DM43 in all doses used was able to increase the fibronectin deposition leading to adhesion increase.

The inhibition of MMPs activities by DM43 can result on induction of cellular death on stromal and tumoral cells, beyond the deposition of MEC. These results suggest, the use of DM43, as a new candidate for anti-cancer therapy, just like, for patients with osteoarthritis.

Nosso grupo já vem há muitos anos investigando a resistência natural de animais a venenos de serpentes. Do soro do gambá (*Didelphis marsupialis*) foi isolada e caracterizada uma glicoproteína ácida de 43kDa (DM43), capaz de inibir as atividades de metaloproteases encontradas nos venenos por formação de complexos não-covalentes (Neves-Ferreira *et al.*, 2000). No atual trabalho, procuramos avaliar se DM43 seria capaz de inibir outras metaloproteases, como as MMPs, que estão envolvidas em diversos processos patológicos, como a osteoartrite e câncer.

Utilizamos linhagens celulares normais (3T3-fibroblastos) e tumorais (MDA-adenocarcinoma de próstata e MCF7-adenocarcinoma de mama) e líquido sinovial de pacientes com osteoartrite, como fontes de MMPs. As MMPs interagiram com DM43 acoplada a uma coluna de afinidade. Por imunorevelação foram identificadas como MMPs 2, 3 e 9. Em ensaios utilizando a fibronectina e a caseína como substratos, DM43 mostrou-se capaz de inibir a atividade proteolítica destas metaloproteases.

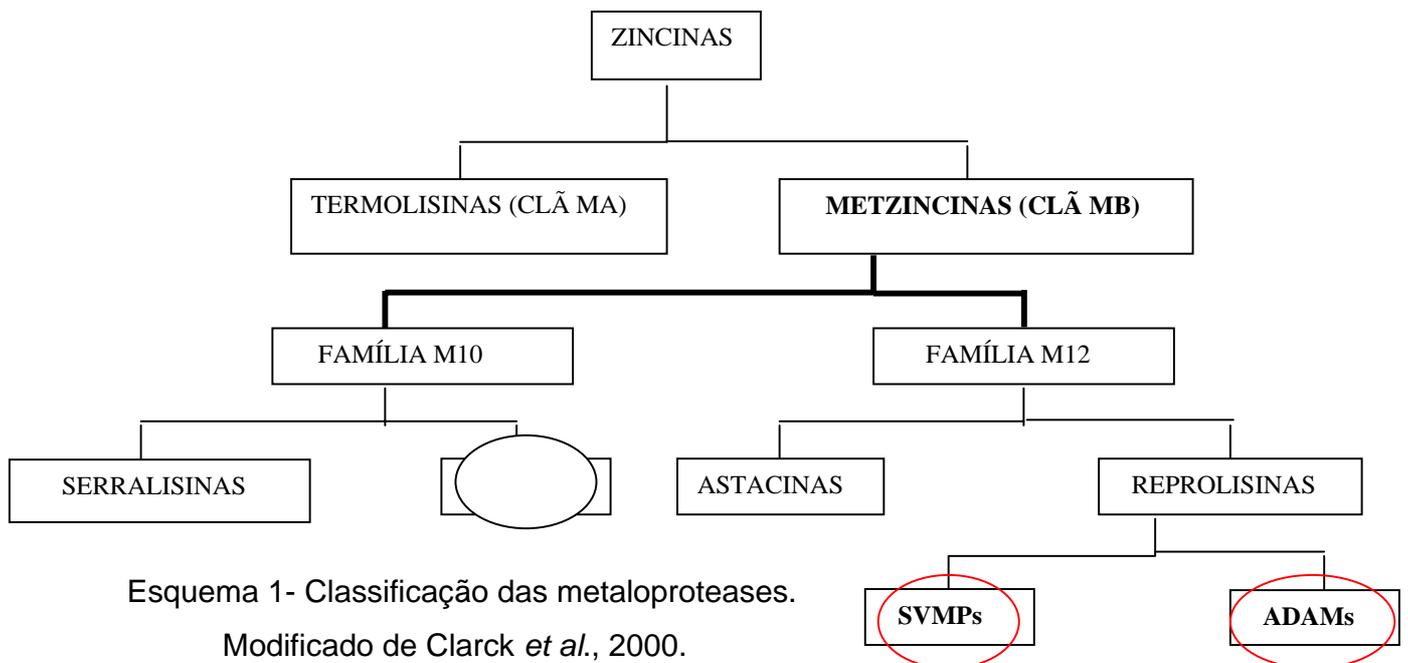
O número de células, o ciclo e a morte celular foram analisadas utilizando como tratamento DM43 em 3 diferentes doses (10, 250 e 1000 ng/mL). Nossos resultados demonstraram uma diminuição no número de fibroblastos e de células de adenocarcinoma de mama, utilizando as três doses de tratamento. A análise do ciclo celular não demonstrou alteração, em relação ao controle. Portanto, a diminuição de celularidade ocorreu em consequência à indução de morte celular nestas linhagens, por via ainda não elucidada. O aumento da morte, em relação ao controle não tratado, foi de pelo menos 2x em fibroblastos e de quase 7x em adenocarcinoma de mama (utilizando a maior dose de DM43). Além disto, verificou-se a capacidade de DM43 inibir a degradação da matriz extracelular produzida por estas enzimas, levando a um intenso depósito de fibronectina, e por conseguinte, um grande aumento de adesão celular.

Estes resultados indicam o uso potencial de DM43 na terapia anti-tumoral, bem como, para pacientes com osteoartrite.

I.1- Metaloproteases

O termo metaloprotease compreende uma vasta gama de peptidases classificadas em pelo menos 30 famílias e agrupadas em 5 clãs, de acordo com sua seqüência consenso de ligação do metal (normalmente o zinco). No sítio catalítico do clã MB o átomo de metal liga-se a três resíduos de histidina: dois da seqüência de consenso de ligação e o terceiro localizado seis resíduos após a segunda histidina (HEXXHXXGXXH) (Perales e Domont, 2002).

No clã MB (Metzincinas) estão localizadas as metaloproteases mais importantes do ponto de vista médico. As SVMPs (Snake Venoms Metalloproteinases) são metaloproteases de venenos de serpentes responsáveis pelo efeito hemorrágico dos venenos (Gomis-Rüth, 2003), as ADAMs e as MMPs estão especialmente associadas ao câncer humano e a diversos outros processos fisiológicos e patológicos (De Clerck, 2000).



Todas as metaloproteases são sintetizadas como zimogênios, ou seja, na forma de um precursor inativo. A ativação ocorre quando a interação entre o átomo de metal do sítio ativo e a cisteína do domínio pró é rompida, deixando o sítio ativo acessível. Este mecanismo conhecido como “cysteine switch” pode ocorrer por remoção proteolítica do pró-peptídeo, ou por remoção da cisteína por organomercúricos ou agentes caotrópicos, que deixam a enzima ativa, possibilitando a clivagem do pró-peptídeo autocataliticamente (Vu e Werb, 1998).

1.1a) Metaloproteases de venenos de serpentes - SVMPS

As metaloproteases de venenos de serpentes pertencem à família das Metzincinas, como mostra o diagrama do esquema (1), cujos membros possuem características comuns, como sua topologia tridimensional, sua seqüência de consenso de ligação do zinco e a presença de um resíduo de metionina conservado, que forma a base de seu sítio ativo (Nagase e Woessner, 1999).

As SVMPS, como todas as metaloproteases, são sintetizadas como zimogênios e sofrem processamento proteolítico para gerar as formas ativas (Tanjoni *et al.*, 2003). Em 1994, estudos estruturais agruparam-nas em 4 classes (PI-PIV), de acordo com a organização das proteínas maduras em domínios (Hite *et al.*, 1994). PI contém apenas o domínio metaloprotease; os membros da classe PII possuem um domínio desintegrina, além do metaloprotease; PIII possui tanto um domínio tipo-desintegrina, quanto um domínio rico em cisteína, além do metaloprotease e, finalmente, a classe PIV, com estrutura similar à classe PIII e com um domínio adicional tipo-lectina (Mebs, 1998).

O domínio catalítico das SVMPs compartilha grande similaridade funcional e estrutural com o domínio metaloprotease das MMPs (Blundel, 1994), conservando todos os resíduos de ligação de zinco e a estrutura tridimensional envolvida na catálise. A especificidade de substratos de SVMPs também é similar às MMPs, envolvendo os componentes da matriz extracelular (¹MEC) localizados na membrana basal da microvasculatura. A clivagem destas proteínas, com o conseqüente enfraquecimento da estrutura capilar, constitui o mecanismo pelo qual as SVMPs induzem hemorragia nas vítimas de envenenamento (Gutiérrez e Rucavado, 2000). Apesar de algumas similaridades, as SVMPs possuem identidade seqüencial de apenas 15% com as metaloproteases de matriz (MMPs) e de 30% com as metaloproteases com domínio desintegrina símile (ADAMs) (Nagase e Woessner, 1999).

As SVMPs são as principais responsáveis pela hemorragia que ocorre nos envenenamentos ofídicos. Estão presentes em altas concentrações nos venenos de serpentes da família Viperidae e, recentemente, também foram identificadas (em menores proporções) em venenos de alguns membros da família Elapidae (Matsui *et al.*, 2000).

¹MEC- moléculas secretadas que são imobilizadas do lado externo das células. Auxiliam na adesão celular e transmitem sinais através da interação com receptores de adesão presentes na superfície celular. Subdividida em membrana basal e tecido conectivo intersticial.

A resistência natural de alguns animais aos envenenamentos por serpentes datam de 1781, quando Abbé Felice Fontana, o fundador da Toxinologia moderna, escreveu seu clássico *Traité sur le Venin de la Vipère*, que descrevia algumas das propriedades dos venenos, assim como a resistência natural de alguns animais (Hawgood, 1995). Mais de

um século depois, em 1922, Phisalix, em seu livro *Animaux Venimeux et Venins* relatou a resistência a venenos de serpentes, de um grande número de animais, entre eles peixes, invertebrados e mamíferos. Interessantemente, ainda hoje, alguns destes animais são objeto de estudos, assim como o porco-espinho (*Erinaceus europaeus*) (Omori-Satoh *et al.*, 2000); o mangusto (*Herpestes edwardsii*) (Qi *et al.*, 1995) e o gambá Sul-Americano (*Didelphis marsupialis*) (Neves-Ferreira *et al.*, 2002).

I.1b) Metaloproteases com domínio desintegrina símile - ADAMs

A subfamília destas metaloproteases é constituída por cerca de 30 membros, que foram identificados em organismos como os nematódios (*Schizosaccharomyces pombe*) até em humanos. São proteínas com multidomínios, que além de possuir um peptídeo sinal, um pró-domínio e um domínio tipo-metaloprotease, também possuem um domínio desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio similar ao fator de crescimento epidermal (EGF) e um domínio transmembranar, seguido por uma cauda citoplasmática (De Clerck, 2000). O domínio desintegrina contém, na maioria dos casos, o motivo RGD (arginina, glicina e ácido aspártico), podendo ocorrer com modificações (SSCD, TDE, ESE), estes ligam-se às integrinas; o domínio transmembranar é responsável pela ancoragem destas metaloproteases na superfície celular; a função do domínio rico em cisteína ainda não foi totalmente esclarecida, mas parece estar relacionada à adesão celular (De Clerck, 2000).

As ADAMs estão intimamente relacionadas a diversos processos da adesão celular e processamento proteolítico de importantes moléculas de superfície celular (Tang, 2001). Já foi descrito o papel essencial das ADAMs 1 e 2 durante a fertilização (Blobel *et al.*, 1992); também já foi demonstrada a participação da ADAM 12 na fusão de mioblastos durante o desenvolvimento muscular (Yagami-Hiromasa *et al.*, 1995) e, não menos importante é a participação da ADAM17 (TACE) na liberação proteolítica de citocinas ancoradas por estruturas transmembranares à superfície celular, como o TNF- α (Black *et al.*, 1997).

As ADAMs também podem estar associadas a alguns quadros patológicos envolvendo comprometimento inflamatório como a asma, hipertrofia cardíaca, artrite reumatóide, osteoartrite e choque endotóxico. Parecem também interagir com integrinas, sugerindo uma potencial participação destas (integrinas) em processos de metástase de células tumorais humanas, via adesão celular e atividade proteolítica (Gomis-Rüth, 2003).

Mais recentemente, uma nova família de proteínas relacionadas às ADAMs foi identificada. Coletivamente conhecidas como ADAMTS, possuem as mesmas características de domínios protease, tipo-desintegrina e rico em cisteína das ADAMs, porém possuem um motivo adicional de trombospondina tipo I (TS). Além disto, não possuem o domínio transmembranar e nem a cauda citoplasmática, localizando-se portanto livre na matriz extracelular. Ainda assim, têm a capacidade única de ligar-se à matriz através do domínio TS (Tang, 2001); (De Clerck, 2000).

1.1c) Metaloproteases de matriz - MMPs

A subfamília das MMPs é constituída por aproximadamente 26 membros encontrados principalmente em humanos, roedores e anfíbios. Estas metaloproteases são zinco e cálcio dependentes e coletivamente têm a capacidade de degradar componentes da matriz extracelular (MEC) e clivar proteínas sinalizadoras (Smith *et al.*, 2002). Podem ser classificadas em 5 subfamílias de acordo com a especificidade pelo substrato, estrutura primária e localização celular: colagenases (MMP - 1, -8 e -13), gelatinases (MMP -2 e -9), estromelinas (MMP -3 e -10), tipo membranares (MT1 - 4 MMP ou MMP -14, -15,-16, -17, e MMP - 24, -25) e matrilisinas (MMP -7, -26) (Murphy *et al.*, 2002).

As MMPs possuem 3 domínios estruturalmente bem preservados: (1) domínio catalítico, que é responsável pela hidrólise do substrato; (2) domínio amino-terminal, também conhecido como pró-peptídeo, composto por aproximadamente 80 aminoácidos responsáveis pelo estado de latência das enzimas e (3) domínio carboxi-terminal ou domínio hemopexina, ainda de função não totalmente esclarecida, mas que parece contribuir para a especificidade de substrato. As MT-MMPs possuem ainda um domínio transmembranar para ancoramento da proteína à membrana. Em algumas MMPs, este domínio pode ter função no processo de ativação da enzima (Klein *et al.*, 2004).

As MMPs são sintetizadas como enzimas latentes em grânulos de células inflamatórias, células tumorais, células estromais e endoteliais,

porém são frequentemente secretadas ou podem estar ancoradas à superfície das células ou a outras proteínas da matriz extracelular. Sua síntese é regulada por muitos fatores como citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, transformação celular e estímulo físico (Nagase e Brew, 2002). A transcrição geralmente ocorre em níveis muito baixos, que são rapidamente aumentados em situações de remodelamento, inflamação, trauma e câncer (Coussens *et al.*, 2002).

Na fisiologia normal, as atividades da MMPs estão associadas com vários processos como a implantação de blastocistos, desenvolvimento embrionário, crescimento de nervos, ciclo endometrial, regressão uterina pós-parto, regressão mamária, ruptura de membranas fetais, remodelamento de ossos, cura de feridas, angiogênese, apoptose, entre outras (Woessner, 1998).

Os dois principais pontos de regulação das atividades das MMPs são a ativação de enzimas latentes (pró-MMPs) e sua inibição por inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs), e/ou, α_2 -macroglobulinas, inibidores menos específicos encontrados no plasma humano. Geralmente, os TIMPs encontram-se em equilíbrio com as MMPs. Contudo, em alguns processos patológicos, os níveis de MMPs aparecem muito elevados, sem o concomitante aumento dos TIMPs, ocorrendo o desequilíbrio da homeostase da MEC (Woessner, 2001).

A tabela abaixo, modificada de (Woessner, 1998), mostra as MMPs identificadas até o momento, sua nomenclatura e massas moleculares.

MMP	nome	*Massa Molecular (latente/ativa) kDa
1	colagenase 1	52/42
2	gelatinase A	72/66
3	estromelisina 1	60/55/45* ³ /28* ³
7	matrilisina	28/19
8	colagenase 2	85/64
9	gelatinase B	92/83/67* ¹
10	estromelisina 2	52/44
11	estromelisina 3	51/46
12	elastase macrófago	52/20
13	colagenase 3	52/42
14	MMP tipo membranas 1	64/54
15	MMP tipo membranas 2	71/61
16	MMP tipo membranas 3	66/56
17	MMP tipo membranas 4	62/51
18	colagenase 4	53/42
19	sem nome	54/45
20	enamelisina	54/22
21	XMMP	70/53
22	CMMP	51/42* ²
	MMP-C31* ²	
	MMP-H19* ²	
	MMP-Y19* ²	
	envelisina	63/48* ²
	MMP do grão de soja	31/19* ²
	fragilisina	43/21* ²

* Massas baseadas na seqüência cDNA sem o peptídeo sinal.

*¹ (Okada *et al.*, 1992); *² (Woessner, 1998); *³ (Nagase, 1998).

1.2- Metaloproteases de matriz (MMPs) x doenças

Como já vimos, as MMPs estão envolvidas na regulação de diversos processos fisiológicos (Gomis-Rüth, 2003). Contudo, a expressão exacerbada ou sua ausência podem levar a inúmeras patologias, como a destruição de cartilagens na osteoartrite e artrite reumatóide, aneurisma, infarto agudo do miocárdio e câncer (Souza e Line, 2002). As mais recentes descobertas mostram que as MMPs estão também relacionadas à ruptura da barreira hemato-encefálica, apoptose neural, demência associada ao HIV, aterosclerose, esclerose múltipla e doença de Alzheimer (Gomis-Rüth, 2003).

Nesta tese vamos abordar duas enfermidades importantes do ponto de vista de saúde pública, e que até o momento não têm perspectivas concretas de cura. Ambas têm a participação de MMPs em todo curso da doença.

1.2.a) Osteoartrite

A osteoartrite, antes conhecida como osteoartrose ou simplesmente artrose, é a doença articular mais comum em humanos. Acomete cerca de 25% da população com mais de 60 anos (Verzijl *et al.*, 2003). No Brasil, mais de 15 milhões de pessoas sofrem desta enfermidade (WWW.msd-brazil.com), que é caracterizada por progressiva destruição das cartilagens da superfície de diartroses

(articulações que unem ossos longos) por enzimas que degradam a matriz extracelular (Smith, 1999). Esta destruição da MEC compromete os tecidos das articulações, ossos e até mesmo, ligamentos articulares e tendões, levando, em alguns casos, à completa perda de mobilidade (Murphy *et al.*, 2002).

Apesar da osteoartrite ser considerada uma doença articular não-inflamatória, ocorre na membrana sinovial uma excessiva expressão de citocinas pró-inflamatórias produzidas pela sinóvia inflamada, condrócitos ativados ou por células inflamatórias infiltradas. Em particular, a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF em inglês)- α estão predominantemente envolvidos na inicialização e progressão da destruição da cartilagem articular, promovendo a síntese e liberação de proteases (Fuchs *et al.*, 2004).

Apesar da participação de proteases de várias classes neste processo, já foi demonstrado que a maior parte das enzimas envolvidas pertencem à família das MMPs (Murphy *et al.*, 2002). Alguns estudos evidenciaram a superexpressão dos níveis de MMPs, tanto em modelos animais de osteoartrite, quanto na cartilagem e no líquido sinovial de pacientes humanos com a doença (Janusz *et al.*, 2002). Dentre as MMPs, as principais envolvidas são MMP-1, MMP-3, MMP-8 e MMP-13. A regulação destas enzimas não é somente controlada por citocinas, mas também pela ativação de seus precursores (pró-MMPs) pelas próprias MMPs. Neste contexto, a MMP-3 é considerada a principal

ativadora destas formas, incluindo pró-MMP-1, pró-MMP-8, pró-MMP-9 e pró-MMP-13. A atividade das MMPs é altamente regulada pelos TIMPs, porém, durante a patologia, o excessivo aumento das MMPs não é compensado suficientemente pelo aumento da produção do inibidor (Fuchs *et al.*, 2004).

A terapêutica atual para pacientes com osteoartrite consiste no uso de antiinflamatórios, que visam apenas a diminuição da dor e minimização da incapacidade motora. Em alguns pacientes são administrados antiinflamatórios não-esteroidais (NSAIDs), que apesar de trazer grande alívio da dor, apresentam efeitos colaterais, que incluem úlceras gástricas, distúrbios renais e depressão. Outros pacientes são medicados com corticóides, que são injetados diretamente na cartilagem a fim de reduzir a inflamação. Mais recentemente, uma nova classe de NSAIDs, conhecida como inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2), foi descoberta e aprovada para uso em pacientes com a doença. Este inibidores agem bloqueando a enzima COX-2, que estimula a resposta inflamatória, sem no entanto bloquear a enzima COX-1, como ocorria com os tradicionais NSAIDs (Hinton *et al.*, 2002).

Há estudos que visam a inibição ou bloqueio das MMPs para o tratamento desta doença. Alguns deles apontam como principal alvo molecular a MMP-3, já que é uma enzima que age sobre grande parte das proteínas da MEC, além de possuir a capacidade de ativar outras

MMPs. Por ser superexpressa neste processo fisiopatológico é utilizada inclusive com marcador da doença (Lohmander *et al.*, 1993). Até o momento, nenhum estudo sistemático foi realizado utilizando inibidores de MMPs em doentes portadores desta doença.

1.2.b) Câncer (neoplasias)

As neoplasias podem afetar todos os seres vivos da natureza, não sendo exclusivas do reino animal. Entre os animais, afetam tanto os invertebrados quanto os vertebrados (Goldsby *et al.*, 2002).

São proliferações locais de clones celulares atípicos, sem causa aparente, de crescimento excessivo, progressivo e ilimitado, incoordenado e autônomo (ainda que se nutra às custas do organismo, numa relação tipicamente parasitária), irreversível (persistente mesmo após a cessação dos estímulos que determinaram a alteração), e com tendência à perda de diferenciação celular (Goldsby *et al.*, 2002).

O descontrole da proliferação das células ocorre porque os genes regulatórios passam a não atuar de forma adequada, seja por mutações induzidas por fatores externos (fatores químicos, físicos ou biológicos) ou por mutações herdadas (fatores genéticos). Esta perda de controle envolve a ativação de proto-oncogenes, a inativação de genes supressores de tumores e alterações em genes que regulam a apoptose (Goldsby *et al.*, 2002).

Os proto-oncogenes são genes promotores do crescimento e da diferenciação celular, controlando a divisão celular de maneira ordenada. Se um proto-oncogene sofre alguma alteração estrutural (mutação, rearranjo ou translocação) pode levar à formação de uma proteína anormal ou acarretar alterações na regulação da expressão de uma proteína normal (produção aumentada ou diminuída), passando a ser um oncogene. O oncogene é um gene que, quando presente no hospedeiro, pode levar ao aparecimento do câncer (Goldsby *et al.*, 2002).

Os genes supressores de tumores ou antioncogenes “freem” o processo de proliferação celular. A perda destes genes está relacionada ao aparecimento de tumores, mas, na verdade, sua função é regular o crescimento celular e não prevenir a formação de neoplasias, como sugere o nome (Goldsby *et al.*, 2002).

Alterações em genes que regulam a apoptose podem levar à inibição da morte celular e portanto, à “imortalidade” da célula. O p53 é um dos genes responsáveis pela integridade do genoma. É ativado pelo surgimento de DNA alterado, através de mecanismos ainda não totalmente elucidados. Sua ativação produz uma proteína que regula a replicação do DNA, a proliferação celular e a morte celular (Goldsby *et al.*, 2002).

Apesar do sistema imune teoricamente ser capaz de reconhecer e atacar as células tumorais, muitos indivíduos ainda morrem a cada ano em consequência de neoplasias. Isto ocorre porque as células tumorais

têm diversas formas de evadir a vigilância deste sistema. As MMPs estão envolvidas em alguns destes mecanismos de escape, como veremos a seguir (Egeblad e Werb, 2002).

MMPs x resposta imune: Os componentes inflamatórios de infiltrados tumorais incluem uma diversa população de leucócitos (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos), além de citocinas, mediadores solúveis, como TNF- α , interleucinas e interferons, serino-, cisteíno- e metaloproteases (Coussens e Werb, 2001). Linfócitos T citotóxicos e células “*natural killers*” (NKs em inglês) também estão presentes. A proliferação destes linfócitos e a consequente resposta imunológica é regulada por sinalização de citocinas e seu receptor interleucina-2 α (IL-2R α). As MMPs, principalmente a MMP-9, têm a capacidade de clivar IL-2R α , suprimindo a proliferação de linfócitos T e causando imunossupressão (Sheu *et al.*, 2001). Neutrófilos, mastócitos e linfócitos T ativados também podem contribuir para malignidade liberando proteases, fatores angiogênicos e quimiocinas (Coussens e Werb, 2001).

As MMPs 2 e 9 também têm a capacidade de liberar (ativar) os fatores transformadores de crescimento (TGF- β em inglês), um importante inibidor da resposta de linfócito T contra tumores (Yu e Stamenkovic, 2000); (Gorelik e Flavell, 2001).

As MMPs regulam outras respostas celulares com grande relevância na biologia do câncer, incluindo proliferação de células

tumorais, apoptose, migração e invasão, bem como a regulação da angiogênese (Egeblad e Werb, 2002).

MMPs x proliferação celular: Existem algumas causas conhecidas da promoção de proliferação de células tumorais por MMPs. Elas podem agir degradando a MEC, tornando bioacessíveis proteínas, como por exemplo, os fatores de crescimento (Mañes *et al.*, 1999). Além disto, podem degradar componentes da MEC, expondo os sítios que serão reconhecidos por integrinas, regulando indiretamente os sinais de proliferação (Agrez *et al.*, 1994).

MMPs x angiogênese: A angiogênese é um processo de formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Já é conhecido que a angiogênese é um pré-requisito para o crescimento tumoral (Klein *et al.*, 2004). Um dos primeiros eventos da angiogênese tumoral é a degradação de MEC por MMPs, que permite a migração das células endoteliais e posterior proliferação, culminando na formação de novos vasos. As MMPs, especialmente MMPs -2 e -9, estão envolvidas neste processo, principalmente por suas características de degradação (Nguyen *et al.*, 2001).

Os proteoglicanos sulfatados que fazem parte da membrana basal seqüestram fatores de crescimento pró-angiogênicos como os fatores endoteliais do crescimento de veias e fatores de crescimento de fibroblastos (VEGF e FGF). Estudos recentes demonstraram que MMP-9 e MMP-2 (em menor proporção) são essenciais para a

mobilização de fatores seqüestrados, dando início à angiogênese tumoral. Ainda que a MMP-9 não tenha sido descrita por efetivamente degradar os proteoglicanos, ela já é bem conhecida pela degradação de colágeno IV; esta capacidade pode propiciar a desorganização da membrana basal, levando à liberação dos fatores de crescimento (Bergers *et al.*, 2000).

As MMPs também regulam negativamente este processo ao produzirem fragmentos que são inibidores da angiogênese. A clivagem do plasminogênio pelas MMPs-2, -3, -7, -9 e -12 gera a angiostatina (Dong *et al.*, 1997); (Cornelius *et al.*, 1998); as MMPs-3, -9,-12,-13 e -20 geram a endostatina, fragmento C-terminal do colágeno tipo XVIII (O'Reilly *et al.*, 1997). Outros inibidores como a tunstatina, que são fragmentos de cadeias de colágeno tipo IV e os PEX, fragmentos não-catalíticos de MMP-2, também foram identificados como potentes inibidores da angiogênese. O mecanismo de inibição da tunstatina parece ser via redução da proliferação por apoptose de células endoteliais, enquanto a angiostatina e a endostatina inibem a migração destas células. O mecanismo das PEX ainda não foi totalmente elucidado (Pfeifer *et al.*, 2000).

Estudos *in vivo* com carcinomas humanos demonstraram que as MMPs são predominantemente produzidas por células estromais e células do sistema imune. Após a degradação da matriz e a liberação dos fatores como previamente descrito, a angiogênese é iniciada e o

tumor começa a crescer, recrutando mais células do sistema imune, fibroblastos e outras células estromais, que também produzem fatores de crescimento (Coussens e Werb, 2001).

MMPs x apoptose: A apoptose é um fenômeno morfológico caracterizado pela condensação da cromatina, fragmentação nuclear e diminuição celular. Este tipo de morte ocorre sem a perda da integridade da membrana plasmática, o que evita a resposta inflamatória (Reed, 2002).

Muitas doenças de grande relevância do ponto de vista médico podem ser atribuídas direta ou indiretamente à alterações no processo de apoptose. Desordens podem envolver o acúmulo de células (cânceres, doenças auto-imunes, infecções persistentes e etc) ou perda excessiva de células (isquemias, doenças neurodegenerativas, inflamações, osteoartrite e etc) (Reed, 2002).

As MMPs podem ter comportamento pró ou antiapoptótico. Já é conhecido que as MMPs -3, -7, -9 e -11 têm a capacidade de regular a apoptose. MMP-7, por exemplo, libera FASL (mediador de apoptose transmembranar do receptor de morte FAS) tornando-o solúvel e assim induzindo a apoptose em células epiteliais. Por outro lado, animais deficientes em MMP-7 (“knock-out” para MMP-7) apresentaram 67% de redução no índice de apoptose comparada com aquela verificada em animais normais, corroborando a participação de MMP-7 em morte celular mediada por FASL (Powell *et al.*, 1999). Já MMP-11 suprime apoptose de células tumorais, provavelmente liberando o fator de

crescimento de insulina (IGF em inglês) (Mañes *et al.*, 1999). Este mecanismo ainda não foi totalmente elucidado, já que esta metaloprotease, diferentemente das outras, não tem a capacidade de degradar componentes clássicos da MEC (Wu *et al.*, 2001).

MMPs x metástase e invasão: A metástase tumoral define malignidade, e é a principal causa de morte por câncer. Durante a metástase, as células cancerígenas cruzam inúmeras barreiras da MEC. Em primeiro lugar, cruzam a ²**membrana basal** epitelial e invadem o estroma vizinho; depois entram nos vasos sanguíneos ou linfáticos, estabelecendo uma nova colônia proliferativa (Egeblad e Werb, 2002).

A evidência experimental da participação das MMPs na metástase veio com ensaios *in vivo*, onde a superexpressão dos inibidores endógenos, TIMPs, inibiu a invasão e metástase, enquanto a superexpressão de MMPs-2,-3,-13 e -14 promoveu a invasão (Ahonen *et al.*, 1998); (Deryugina *et al.*, 1997). Em ensaios de metástase, o número de colônias formadas nos pulmões de camundongos foi reduzido pela diminuição na expressão de MMP-9 em células cancerígenas (Hua e Muschel, 1996).

De fato, as MMPs -2 e -9 são as mais estudadas nos processos neoplásicos. Muitos estudos demonstraram a relação entre o aumento da expressão destas duas metaloproteases e aumento de metástase e do estágio tumoral (Hanemaaijer *et al.*, 2000). Estas metaloproteases

também são consideradas as principais responsáveis pela penetração de células cancerígenas através da membrana basal (Ala-Aho *et al.*, 2002).

²*membrana basal: É um fino e flexível emaranhado que separa as células epiteliais do estroma. Constituída por colágeno tipo IV, fibronectina, vitronectina, laminina e proteoglicanos. Sua composição é a mesma por todo o corpo.*

No caso de melanomas, através de imuno-histoquímica foi demonstrado que a MMP-9 é especialmente expressa durante a fase inicial de crescimento horizontal do tumor, já que esta enzima é dificilmente encontrada em tumores espessos ou metástase. Ao contrário, a MMP-2 aparece muito aumentada em amostras teciduais de tumores de grande espessura, demonstrando uma correlação entre a expressão de MMP-2 e a formação de metástase (Kurschat e Mauch, 2000).

Como já vimos, outras metaloproteases também estão envolvidas em processos tumorais, como as ADAMs, por exemplo, que têm sua função mais focada na regulação de sinais de crescimento e adesão das células tumorais (Chang e Werb, 2001).

Diante de todas estas implicações das MMPs no câncer, inúmeros agentes estão sendo desenvolvidos para inibir suas atividades. O bloqueio da síntese das MMPs pode ser feito de forma direta, transfectando células com RNAm ou oligonucleotídeos “antisense” ou degradando o RNAm com ³**ribozimas**; ou de forma indireta, reduzindo sua expressão por inibição do sinal de transdução que induz transcrição das MMPs.

³ **ribozimas** são moléculas de RNA que funcionam como enzimas exercendo uma atividade catalítica. Podem ser desenhadas para clivar RNAs específicos, inibindo a síntese protéica.

⁴ **toxina anthrax** é uma toxina secretada pela bactéria *Bacillus anthracis* que consiste em um antígeno protetor, um fator edematogênico e um fator letal. Após clivagem por uma protease, estes fatores se complexam, são endocitados e translocados para o citossol, onde agem citotóxicamente.

O desenvolvimento de agentes citotóxicos ativados por MMPs também tem sido difundido. São proteínas recombinantes contendo **toxina anthrax** fusionada ao sítio ativo das MMPs. Quando as proteínas são ativadas pela clivagem das MMPs na superfície celular, estas são internalizadas pela célula, levando-as à morte celular (Egeblad e Werb, 2002).

Existem inúmeros mecanismos estudados para o controle das MMPs envolvidas em patologias, um dos caminhos de inibição é o bloqueio das suas atividades enzimáticas por inibidores, como veremos a seguir.

1.3- Inibidores de Metaloproteases

1.3.1) Inibidores Sintéticos

O desenvolvimento de terapias focadas na inibição das MMPs vem crescendo muito nos últimos anos. O uso de inibidores sintéticos vem sendo testado na indústria farmacêutica, sem resultados relevantes

até o momento, por apresentar baixa bioacessibilidade, podendo levar ao aparecimento de dores e inflamações severas como efeitos colaterais (Coussens *et al.*, 2002).

O primeiro inibidor sintético de MMP foi desenvolvido nos anos 80; estas moléculas eram pseudopeptídeos baseados na estrutura do colágeno. Agiam ligando-se reversivelmente ao sítio ativo da MMP de forma estereoespecífica. O grupo que se ligava ao zinco, neste caso, ácido hidroxâmico, quelava o sítio. Este composto mostrou uma vasta gama de especificidade por membros da família de MMPs. Apesar disto, mostrou pouca biocompatibilidade oral (Brown, 1998).

Em função disto, novos inibidores foram desenhados, utilizando dois preceitos fundamentais. 1) deveriam ser compostos com biocompatibilidade oral e 2) com capacidade de inibição seletiva contra MMPs individuais. Na prática não funcionou, pois estes compostos não tinham seletividade para uma MMP em particular (Brown, 1998).

Nos últimos 30 anos, as MMPs ainda vêm sendo consideradas promissores alvos para terapia contra o câncer. Alguns inibidores foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, como o Neovastate, um extrato de cartilagem de tubarão que é capaz de inibir as MMPs. Este inibidor demonstrou efeitos anti-angiogênicos em animais de experimentação e agora está sendo testado na clínica para o tratamento de metástase de carcinoma renal (Egeblad e Werb, 2002).

Além disto, outros agentes foram desenvolvidos a partir de modificações químicas na família das tetraciclinas (separavam o antibiótico da atividade inibitória de proteases). Este medicamento foi capaz de inibir tanto a atividade quanto à síntese das MMPs (Brown, 1998).

Atualmente, existem 5 inibidores em estágios avançados de testes na clínica: marimastate sendo testado contra câncer pancreático; BMS-275291, em câncer de pulmão; prinomastate, em diversos tipos de tumores de estágios iniciais; um análogo da tetraciclina, utilizado em sarcoma de Kaposi e, finalmente, o Neovastate, em modelos de carcinoma renal (Coussens *et al.*, 2002).

1.3.2) Inibidores naturais

1.3.2a) Inibidores teciduais de metaloproteases - TIMPs

São inibidores endógenos específicos das atividades das MMPs em tecidos. Quatro destes inibidores foram identificados em vertebrados (TIMP-1 a - 4), porém inibidores homólogos também foram descritos em *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans* (Brew *et al.*, 2000).

Os quatro membros descritos são proteínas homólogas de aproximadamente 21-29kDa. Em mamíferos, possuem 2 domínios, com aproximadamente 125 resíduos N-terminais e 65 C-terminais. Cada domínio é estabilizado por 3 pontes dissulfeto (Brew et al., 2000). O domínio N-terminal contém um motivo repetitivo altamente conservado (CXC), que é responsável pela inibição das MMPs; já o domínio C-terminal confere funções específicas como a capacidade de TIMP-1 e TIMP-2 de ligar-se às pró-MMP-9 e pró-MMP-2, respectivamente, ou a capacidade de TIMP-3 de ligar-se à MEC (Bond et al., 2000). As diferenças entre os membros desta família incluem o grau de glicosilação, massa molecular, seqüência e localização pós-secretória. TIMPs -1, -2 e -4 são solúveis no meio extracelular, enquanto o TIMP-3 está ligado à MEC, o que deve auxiliar na preservação da integridade desta matriz (Smith et al., 2002). A divergência nas seqüências entre os 4 TIMPs também podem explicar a diferença funcional entre os membros. Os efeitos das substituições de alguns aminoácidos podem justificar por exemplo, a afinidade por

diferentes MMPs, assim como os diversos papéis biológicos exercidos por estes inibidores (Brew et al., 2000).

Os TIMPs ligam-se não-covalentemente a MMPs ativas, com alta afinidade e estequiometria de 1:1 (mol:mol); alguns deles também têm a capacidade de ligar-se a formas pró de MMPs, regulando o processo de ativação (Nagase e Woessner, 1999).

Entre os 4 TIMPs, TIMP-3 é um membro particularmente interessante, que possui propriedades biológicas únicas. Por estar fortemente ligado à MEC, esta interação pode inibir “shedases” ou regular os movimentos através da membrana basal e estroma. TIMP-3 não inibe apenas as MMPs mas também é capaz de inibir outras metaloproteases, como as ADAMs e ADAMs-TS (Nagase e Brew, 2002).

O efeito mais interessante relacionado a TIMP-3 é a sua capacidade de induzir apoptose em vários tipos celulares, incluindo células tumorais (Bond *et al.*, 2000). Diferentemente, os TIMPs -1 e -2 inibem apoptose em células B e melanomas (Guedez *et al.*, 1998a);(Valente *et al.*, 1998). A atividade antiapoptótica de TIMP-1 é independente da inibição de MMPs (Guedez *et al.*, 1998b).

Outras atividades totalmente desvinculadas da atividade inibitória já foram descritas. Por exemplo, TIMP -1 e -2 possuem atividade mitogênica em alguns tipos celulares, já que quando alquilados (sem atividade inibitória contra MMPs), mantêm sua atividade promotora de

crescimento celular. TIMP-2 também tem a capacidade de inibir o fator de crescimento de fibroblastos, que induz o crescimento de células endoteliais humanas (Nagase e Brew, 2002).

As expressões de MMPs e TIMPs foram comparadas em tecidos normais e tumorais. Embora algumas diferenças na expressão tenham sido observadas, estas não estão correlacionadas com o potencial metastático das células neoplásicas e, portanto, não podem ser utilizadas como um indicador de prognóstico. Contudo, o aumento da expressão dos TIMPs podem representar uma resposta do estroma à invasão tumoral (Airola *et al.*, 1999).

Apesar disto, outras linhas de trabalhos demonstraram que os TIMPs podem favorecer a progressão tumoral, como os TIMPs-1 e -2, que inibem a apoptose em células tumorais; TIMP-2 e -3, que podem promover a proliferação de células tumorais e TIMP-1, que promove a angiogênese. Ainda não está esclarecido quando estes efeitos ocorrem em função de inibição já que, como foi dito, os TIMPs possuem outras funções independentes da inibição de MMPs (Egeblad e Werb, 2002).

Estudos clínicos utilizando moléculas recombinantes de TIMPs não demonstraram o resultado esperado, apresentando fraca atividade anti-tumoral. Isto pode ser atribuído em parte à não-seletividade na inibição das MMPs; além disto, a inibição mostrou-se insuficiente para o tratamento em determinados estágios da doença (Lambert *et al.*, 2004).

Outros modelos demonstraram que os TIMPs não apresentam grande potencial terapêutico devido a sua curta vida-útil (Curran e Murray, 2000). Futuramente, pensa-se no uso dos TIMPs como terapia genética no sítio da doença, resultando na disponibilidade e ação do inibidor diretamente no local desejado (Klein *et al.*, 2004).

1.3.2b) Inibidores plasmáticos de metaloproteases - α_2 -macroglobulinas

São glicoproteínas com massas moleculares de 725 kDa, constituídas de 4 subunidades idênticas ligadas em pares por pontes dissulfeto. Liga-se e inibe irreversivelmente as quatro classes catalíticas de proteases (serino, cisteíno, aspartato e metaloproteases), independentemente do substrato específico de cada uma delas. A ligação da protease e da α_2 -macroglobulina é iniciada pela proteólise da região isca (“bait region”), que entra numa complexa mudança conformacional, fazendo com que a α_2 -macroglobulina enlaçe a protease. O sítio ativo da enzima não fica bloqueado, mas sua ação está estericamente obstruída (Woessner, 1998).

Alguns experimentos de competição demonstraram a capacidade da α_2 -macroglobulina em inibir as MMPs -1 e -3 de modo mais eficiente do que os TIMPs (Enghild *et al.*, 1989).

1.3.2c) Inibidores isolados do soro do gambá *Didelphis marsupialis*

Desde a década de 70, nosso grupo investiga a resistência de marsupiais brasileiros a venenos de serpentes. As primeiras observações foram feitas pelo Dr. Haity Moussatché, que demonstrou a resistência do gambá *Didelphis marsupialis* a diversos venenos de serpentes, em especial a serpente brasileira *Bothrops jararaca* (Moussatché e Daló, 1978, 1982; Moussatché et al., 1981; Moussatché e Melendez, 1979; Moussatché et al., 1980)

Do soro do gambá *Didelphis marsupialis* foi isolada uma fração antibotrópica (FAB) capaz de inibir as atividades hemorrágica, letal, mionecrótica, hiperalgésica e edematogênica produzidas por venenos de serpentes (Perales et al., 1994).

A FAB é constituída fundamentalmente por 3 proteínas que foram isoladas e caracterizadas. De acordo com as suas massas moleculares determinadas por espectrometria de massas MALDI-TOF, foram denominadas DM40, DM43 e DM64.

DM40 e 43 são glicoproteínas muito ácidas, com pontos isoelétricos em torno de 3,5. Ambas demonstraram capacidade de inibir a hidrólise da caseína, fibrinogênio e fibronectina induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*. Estas atividades são tipicamente relacionadas às metaloproteases dos venenos, e portanto foram totalmente inibidas pelo agente quelante de metal EDTA. A hidrólise do substrato fluorogênico sintético Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-Nba por jararagina, enzima isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, foi completamente inibida utilizando relação molar de 2:1 (mol de DM43: mol de enzima). Nas mesmas condições, DM40 inibiu a hidrólise do substrato sintético em 80% (Neves-Ferreira et al., 2000).

Mais recentemente, foi isolado e caracterizado o terceiro inibidor presente na fração antibotrópica, denominado DM64. Trata-se de uma

glicoproteína ácida, de massa molecular 63.659 Da. É estruturalmente homóloga às outras duas DMs, porém não possui atividade antimetaloproteásica, e sim uma importante atividade antimiotóxica. É capaz de neutralizar a miotoxicidade in vivo e a citotoxicidade in vitro das miotoxinas I e II isoladas do veneno de *Bothrops asper*, sem interferir com a atividade fosfolipásica da miotoxina I (Rocha et al., 2002).

DM43 é o inibidor mais bem caracterizado até o momento; trata-se de uma glicoproteína homodimérica (monômero de 43kDa), que isoladamente também demonstrou a capacidade de inibir as atividades letal, hiperalgésica e edematogênica do veneno de *Bothrops jararaca*. Foi testada, também, contra algumas metaloproteases isoladas do mesmo veneno (jararagina e botrolisina), sendo capaz de inibir totalmente a atividade proteolítica de ambas utilizando o fibrinogênio como substrato. A inibição ocorre via formação de complexo não-covalente, onde o domínio metaloprotease das enzimas parece ter papel essencial na interação com a DM43, já que em ensaios utilizando a jararagina-C, fragmento da jararagina desprovido do domínio metaloprotease, não foi observada interação. Corroborando esta hipótese, DM43 interage de maneira eficaz com a botrolisina, enzima que só possui o domínio metaloprotease. Análises estequiométricas indicam que um monômero de

inibidor se liga a uma molécula de metaloprotease (Neves-Ferreira et al., 2002).

DM43 foi completamente seqüenciada e apresentou 37% de identidade com a α 1B-glicoproteína, uma proteína plasmática humana de função desconhecida. Possui três domínios tipo-imunoglobulina homólogos aos domínios de α 1B-glicoproteína e ambas proteínas pertencem à superfamília gênica das imunoglobulinas (Neves-Ferreira et al., 2002); (Perales e Domont, 2002).

Neste trabalho pretendemos investigar o uso de DM43, já descrita como potente inibidor de metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs), como inibidor de outra subfamília de metaloproteases, as MMPs.

Embora haja muitos estudos sobre a inibição das MMPs como principal alvo molecular em doenças como a osteoartrite e o câncer, pouco ainda se sabe sobre a eficácia desta inibição.

Só em 1998, foram concedidas nos Estados Unidos 57 patentes utilizando este racional de inibição para tratamento de doenças com envolvimento de metaloproteases. O uso dos inibidores segue linhas distintas: a) alguns autores sustentam a hipótese do desenvolvimento de inibidores específicos, dependendo do estágio da doença, já que o perfil de metaloproteases pode ser modificado no curso desta; b) outros defendem o uso de uma droga com amplo espectro de inibição das MMPs, levando em consideração o grande número de enzimas existentes; c) outra linha propõe a hipótese do desenvolvimento de um inibidor capaz de neutralizar, além das MMPs, outras metaloproteases, como as ADAMs por exemplo que, como vimos, também estão envolvidas nestes processos patológicos.

De fato, muitas drogas estão em fase de testes clínicos, embora até o presente momento, nenhuma delas tenha demonstrado ser totalmente eficaz.

Considerando a homologia existente entre as metaloproteases (SVMPs, MMPs e ADAMs) e a forma com que são inibidas (formação de complexos não-covalentes, com estequiometria de 1:1), decidimos testar a capacidade de DM43, potente inibidor de SVMPs, contra as

MMPs envolvidas tanto na osteoartrite, quanto em neoplasias, como os adenocarcinomas de próstata e mama.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com base no que foi exposto, no presente trabalho objetivamos:

- Verificar a capacidade da DM43 em interagir com metaloproteases de matriz (MMPs) envolvidas em patologias como a osteoartrite e neoplasias;
- Identificar as metaloproteases que eventualmente interajam com DM43;
- Investigar a potencial inibição destas metaloproteases pela DM43;

ESTRATÉGIAS

Para avaliarmos a possível interação de DM43 com MMPs, utilizamos uma linhagem celular de fibroblastos obtida de camundongos. Estas células são capazes de sintetizar a maioria das MMPs existentes na condição fisiológica. Além disto, fizemos uso de duas linhagens celulares proveniente de pacientes portadores de neoplasias e o líquido sinovial de pacientes com osteoartrite, uma vez que estes processos patológicos estão associados à uma intensa participação de MMPs.

MATERIAL

II.1-Obtenção da DM43

Exemplares do gambá *Didelphis marsupialis* foram capturados no Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram anestesiados (quetamina- 5 mg/Kg massa corporal) por via intra-muscular. O sangue foi obtido por punção cardíaca e mantido a 37°C, por 2 horas, para formação do coágulo. Posteriormente, foi centrifugado a 7.800xg (centrífuga refrigerada BECKMAN J2-21M) por 15 minutos a 10°C O soro obtido foi submetido à diálise sob agitação por 24 horas, a 4°C, contra tampão acetato de sódio 0,01M pH 3,7. Após ser novamente centrifugado utilizando as mesmas condições, o sobrenadante foi fracionado por cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-Sepharose (2,5 x 30 cm). A eluição foi feita inicialmente de forma isocrática, utilizando o tampão de diálise, seguida de um gradiente de 0,15 -0,5M de NaCl neste mesmo tampão, com velocidade de fluxo de 30 mL/hora. A fração que continha DM43 foi precipitada com sulfato de amônio (80% de saturação) e submetida à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl Sepharose (1,6 x 20 cm). A eluição foi feita inicialmente com gradiente linear utilizando tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 contendo 0,5 M de sulfato de amônio e o mesmo tampão sem adição de sulfato, com fluxo de 30mL/hora. DM43 foi dialisada por 24 horas contra carbonato de amônio 0,01M e liofilizada. Todas as cromatografias foram realizadas no sistema ÄKTA Purifier da Pharmacia Biotech.

II.2- Obtenção das linhagens celulares (normais e tumorais) e do líquido sinovial de pacientes com osteoartrite

As linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (MDA) e as de mama (MCF7) foram gentilmente cedidas pela Dra. Adriana Bonomo, do Instituto Nacional do Câncer (INCA). A linhagem celular de fibroblastos de camundongo (3T3) foi cedida pelo Laboratório de Pesquisas sobre o Timo da FIOCRUZ. Todas as linhagens foram cultivadas a 37°C em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) acrescido de 10% de soro fetal bovino, na presença de 5% de CO₂.

O líquido sinovial de pacientes com osteoartrite foi cedido pelo Dr. Luiz Roimicher do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ).

II.3- Preparo das células e tratamento

Todas as linhagens (MDA, MCF7 e 3T3) foram plaqueadas (1 x 10⁵ células) em garrafas de poliestireno de 25cm², em meio DMEM, e mantidas antes de cada experimento, por 24 horas (3T3), e por 48 horas, (MDA e MCF7), a 37°C , à 5% de CO₂.

Após este tempo, as células foram tratadas com 3 diferentes concentrações de DM43 (10, 250 e 1000 ng/mL) por 20 horas, nas condições descritas acima.

Após tripsinização e centrifugação a 8000 xg por 5 minutos, as células foram analisadas quanto ao número, ao ciclo e à morte. A

marcação de componentes de matriz extracelular e o estudo da adesão celular foram realizados somente com a linhagem 3T3 de fibroblastos.

II.4- Cromatografia de afinidade acoplada com DM43

O inibidor DM43 isolado foi acoplado covalentemente a uma coluna de afinidade HiTrap® NHS de 5mL (Amersham Biosciences), de acordo com o manual de instruções do fabricante. Os diferentes sobrenadantes (fibroblastos, adenocarcinomas de mama e de próstata) foram precipitados com sulfato de amônio (a 80% de saturação) e dialisados por 24 horas contra o tampão de equilíbrio. Todos os materiais (sobrenadantes celulares e o líquido sinovial de pacientes com osteoartrite) foram ativados com acetato de aminophenil mercúrico - APMA (2mM), por 30 minutos antes de serem submetidos à cromatografia de afinidade, equilibrada com tampão tris-HCl 0,02M + CaCl₂ 0,02M pH 7,5. As frações ligadas foram eluídas com tampão glicina-HCl 0,1M + CaCl₂ 0,02M pH 2,7, a uma velocidade de fluxo de 3mL/min, a 4°C, e coletadas sobre solução de tris 1M para neutralização do pH das frações eluídas.

As amostras eluídas com o tampão glicina/HCl foram precipitadas com TCA e conservadas a -70°C, para posterior análise.

II.5- Precipitação com TCA

A precipitação foi feita após adição de TCA 50% (253 μ L/mL de amostra) e Triton 1% (127 μ L/mL de amostra) à amostra e incubação a 4° C por 20 minutos. Após este tempo, a amostra foi centrifugada a 16.000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado de proteínas foi lavado com acetona gelada por 2 vezes, centrifugado e seco à temperatura ambiente até completa evaporação da acetona ([Stone e Williams, 1993](#)).

II.6- Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, de acordo com o método de Laemmli, 1970. O gel de concentração foi preparado a 4% de bis-acrilamida e o gel de separação foi utilizado na concentração de 12,5%. O tampão de amostra foi preparado com agente redutor (β -mercaptoetanol a 5%). Utilizamos como tampão de corrida tris-glicina 0,192M pH 8,3, contendo 0,1% de SDS. Todas as amostras foram aquecidas à 100°C por 5 minutos antes de serem aplicadas no gel. Utilizamos o sistema Mini Protean II (BIO RAD). As corridas duraram em média 40 minutos, utilizando voltagem constante de 200V. Os géis foram revelados por impregnação por prata ou corados com azul brilhante de Coomassie R-250 para visualização das bandas protéicas.

II.7- Zimografia

Para verificarmos a atividade proteolítica das frações eluídas com tampão glicina/HCl da cromatografia de afinidade, utilizamos a técnica da zimografia, que foi realizada em gel de acrilamida a 10% copolimerizado com 1% de gelatina. As amostras foram preparadas utilizando tampão contendo SDS, e na ausência de agente redutor. A corrida teve duração total de 2 horas, utilizando inicialmente corrente constante de 15mA (por 1 hora) e posteriormente 20mA (1 hora). Após a corrida, o gel foi colocado em tampão tris HCl 50mM pH 7,6 contendo 2,5% de triton X-100 por 1 hora, sob agitação, para renaturação das proteínas. Após este tempo, o gel foi transferido para o tampão de lise tris HCl 50mM pH 7,8 contendo 150mM NaCl e 5mM de CaCl₂, por 24 horas, a 37°C, sob agitação. Os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie R-250 a 0,1%.

II.8- Imunorevelação

As amostras foram eletrotransferidas após eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS com ou sem agente redutor (β -mercaptoetanol a 5%), para uma membrana de polivinildifluoreto (PVDF, Immobilon- P, 0,45 μ M), utilizando o sistema Mini Trans-Blot (BIO RAD). As transferências duraram em média 1 hora a 100V constantes. As revelações foram feitas com anticorpos monoclonais anti-MMP-2, anti-MMP-3 e anti-MMP-9 produzidos em camundongos (R & D systems). O

anticorpo secundário utilizado foi IgG anti-IgG de rato, conjugado com peroxidase (R & D systems).

II.9- Inibição da atividade proteolítica utilizando caseína como substrato

Após a comprovação da atividade proteolítica do líquido sinovial de pacientes com osteoartrite através da técnica de zimografia foram realizados ensaios de inibição utilizando a caseína (1%) como substrato. O soro total de gambá (2,8mg) foi incubado com o líquido sinovial (8,4mg) por 30 minutos a 37°C, antes de ser adicionado à caseína (500µL) contendo 25µL de CaCl₂ 0,08M por 1 hora a 37°C. A reação foi interrompida com adição de TCA 5% (500µL) e a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 735 xg. O sobrenadante foi analisado por espectrofotometria a 280nm.

II.10- Inibição da atividade proteolítica utilizando fibronectina como substrato

A fibronectina (1µg/µL) foi incubada com as frações de fibroblasto, adenocarcinoma de mama e próstata que interagiram com DM43 imobilizada na cromatografia de afinidade. Avaliamos a extensão da

hidrólise com 0,5 -15 μ L destas frações (1mg/mL a 280nm), no tempo de 3 horas, a 25°C.

Escolhemos a dose de 10 μ L das frações contendo as enzimas para testarmos a inibição da degradação da fibronectina. Primeiramente, incubamos misturas de enzima / DM43 (1:10 p:p), a 37°C, por 30 minutos. Utilizamos também a ortofenantrolina (200mM) para inibir as enzimas. Após este tempo, adicionamos 3 μ L de fibronectina (1 μ g/ μ L) por 3 horas, a 25°C. A reação foi parada com adição de tampão amostra Laemmli 5x concentrado, na presença de agente redutor. As análises foram feitas por SDS-PAGE.

Foram utilizados como controles DM43 (100 μ g), ortofenantrolina (200mM) e somente fibronectina (3 μ g) nas mesmas doses.

II.11- Marcação de componentes da matriz extracelular

Após tratamento de 20 h com a DM43 (10, 250 e 1000 ng/mL), os fibroblastos foram incubados com anticorpo monoclonal anti-laminina, anti-fibronectina e anti-colágeno IV, produzidos em camundongo. Após 30 minutos, as células foram lavadas e marcadas com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína. As células foram então analisadas por microscopia de fluorescência. Utilizamos como controle positivo, a linhagem celular de estroma de medula (S17). Como controle negativo, uma imunoglobulina não-relacionada de coelho. Os anticorpos anti-fibronectina e anti-laminina foram utilizados na diluição de 1:100; o anti-colágeno, utilizado na diluição de 1:50.

II.12- Adesão celular e bloqueio

A adesão celular foi realizada em linhagem de fibroblastos tratados com DM43 (10, 250 e 1000 ng/mL) por 20 h. Após este tempo, timócitos frescos isolados de camundongos Balb foram adicionados à cultura (cerca de 50 timócitos por fibroblasto). A co-cultura ficou em estufa a 37°C, a 5% de CO₂, por 30 minutos e, posteriormente, sob agitação por mais 30 minutos. Após este tempo, os timócitos que não aderiram ou ficaram fracamente aderidos foram retirados por inclinação da placa. As células aderidas foram fixadas com metanol (MeOH) absoluto por 7 minutos e coradas com corante de Giemsa por 30 minutos. As células foram posteriormente lavadas com água destilada e analisadas por microscopia óptica.

O bloqueio da adesão foi realizado incubando-se as células tratadas com anticorpo monoclonal anti-fibronectina por 30 minutos. Após este intervalo, timócitos frescos foram adicionados à cultura, seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

Para plotarmos o índice de adesão (IA), foram contados os fibroblastos totais; os timócitos totais e os fibroblastos que continham timócitos aderidos. Foram contadas cerca de 500 células por grupo.

$$IA = \frac{\text{fibroblastos com timócitos aderidos}}{\text{fibroblastos totais}} \times \frac{\text{timócitos aderidos}}{\text{fibroblastos totais}} \times 100$$

II.13- Análise do número de células

As células foram recolhidas em tubos de 15ml e centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos. O precipitado celular foi posteriormente suspenso em 1mL de PBS/soro. As células foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico.

II.14- Análise do ciclo celular

As células foram incubadas com 1 mL da solução de Vindelov ([Vindelov, 1977](#)) (Sigma Co.St.Louis, USA), composta de tris-HCl 3,4mM pH 7,6, iodeto de propídeo (PI) 0,75mM, NP-40 (0,1% v/v), ribonuclease de pâncreas bovino 700UL e NaCl 10mM, por 20 minutos, a 4°C. As células foram analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur® utilizando o “software” Cell Quest. A análise dos resultados foi feita por área e largura, após aquisição em escala linear. Vale ressaltar que a cada experimento, 10.000 células foram analisadas, independentemente da área pré-determinada por parâmetros de tamanho (FSC) e de granulosidade (SSC).

II.15- Análise da morte celular

Para análise de morte, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 20 mg/mL do marcador 7-actinomicina D (7AAD) por 20 minutos e analisadas por citometria de fluxo ([Philpott et al., 1996](#)), como descrito anteriormente.

A análise dos resultados (*DOT PLOT*) foi feita por área e largura, após aquisição em escala linear. Vale ressaltar que a cada experimento, 10.000 células foram analisadas, independentemente da área pré-determinada por parâmetros de tamanho (FSC) e de granulosidade (SSC).

Avaliamos a viabilidade absoluta utilizando o número da celularidade e o valor em porcentagem obtido por *DOT PLOT*. Este número foi subtraído do número total de células para obtermos as células viáveis, representadas por gráfico de barras.

III.1- Cromatografia de afinidade acoplada com DM43

A aplicação dos sobrenadantes de fibroblastos, adenocarcinomas de mama e próstata e do líquido sinovial de osteoartrite (cerca de 2mL por corrida) à coluna de afinidade acoplada com DM43, resultou em 2 picos protéicos a 280nm; o primeiro eluído com o tampão de equilíbrio e o segundo, com o tampão glicina/HCl, como indicado na figura 1. Foram coletados 2,5 mL/tubo, que foram precipitados com TCA para análises posteriores.

As frações ligadas à DM43 (indicadas por setas na figura1) foram nomeadas: MF (MMPs de fibroblastos); MMDA (MMPs de MDA); MMCF7 (MMPs de MCF7) e MLSO (MMPs de líquido sinovial de pacientes com osteoartrite).

III.2-Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras eluídas com glicina/HCl foram precipitadas, ressuspensas em tampão amostra na presença de agente redutor (β -mercaptoetanol) e aplicadas ao gel de acrilamida (12,5%). A análise eletroforética deste material (MF, MMDA, MMCF7 e MLSO) demonstra a presença de 2 bandas protéicas principais em todas as amostras (Figura 2A), com massas moleculares de \cong 67 e 94 kDa, que podem sugerir a presença das MMPs 2 e 9, respectivamente. Outras 3 bandas menos intensas aparecem na região entre 43 e 30 kDa, que podem ser referentes as formas ativas ou intermediárias de MMP-3, como mostra a tabela 1.

III.3- Zimografia

A análise de MF, MMDA, MMCF7 e MLSO por zimografia indica a atividade proteolítica destas amostras, já que todas foram capazes de degradar a gelatina copolimerizada à acrilamida. De acordo com a técnica, a área de hidrólise indica a massa molecular das enzimas. Como podemos observar na figura 2B, todas as amostras apresentam degradação intensa na faixa entre 50,3 e 113 kDa, nestas regiões estão localizadas as formas ativas das MMPs 2 e 9 (\cong 65 kDa) e as formas pró destas MMPs (130, 92 e 72 kDa). Nas raias 3 e 4, referentes a MMCF7 e MLSO observamos degradação também um pouco abaixo de 50,3 kDa, que pode indicar a presença da forma ativa de MMP-3 (45 kDa).

III.4- Imunorevelação

Após SDS-PAGE, todas as amostras (MF, MMDA, MMCF7 e MLSO) foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF. As membranas foram reveladas, separadamente, com anticorpos monoclonais (anti-MMP-2, 3 e 9) produzidos em camundongos. Todas as metaloproteases foram reveladas com os 3 anticorpos. A MMP-2 foi revelada em uma banda de \cong 67kDa (figura 3A). A MMP-3 foi evidenciada em MMDA e

MMCF7 em mais de uma banda protéica (\cong 90 e 70kDa), nas demais só foi verificada a presença da banda de 67 kDa. Com menor intensidade observamos a revelação de bandas na região entre 35,5 e 50,3 kDa, que poderiam corresponder a forma ativa de MMP-3 (45 kDa) (figura 3B). A MMP-9 foi revelada em mais de uma banda protéica em MMDA e MMCF7 (\cong 83, 95, 113 e outra de massa superior não determinada). Já MLSO e MF só revelaram MMP-9 com massa molecular aproximadamente de 83 kDa, provavelmente referente à forma intermediária da enzima (figura 3C).

III.5- Inibição da atividade proteolítica utilizando a caseína como substrato

Após comprovarmos a atividade proteolítica de MLSO através de zimografia, realizamos ensaios desta atividade utilizando a caseína como substrato. A análise espectrofotométrica a 280nm demonstrou a intensa degradação da caseína por MLSO. Quando incubamos este material com soro de gambá, por 30 minutos antes de adicionar a caseína, verificamos inibição total (figura 4).

III.6- Inibição da atividade proteolítica utilizando a fibronectina como substrato

A atividade proteolítica de MMDA e MMCF7 foi testada utilizando a fibronectina como substrato em SDS-PAGE. Embora todas as amostras tenham sido capazes de degradar as cadeias da fibronectina, verificamos uma degradação diferencial entre as amostras. A extensão da hidrólise foi avaliada com 0,5 –15 μL dos materiais testados. MMDA foi capaz de degradar a fibronectina utilizando 10 μL de material, já a degradação por MMCF7 foi verificada com 5 μL do material (figura 5A).

Para os ensaios de inibição utilizamos o volume de 10 μL para ambos materiais. Quando as amostras foram incubadas com ortofenantrolina ambas foram inibidas, demonstrando a natureza metaloproteásica destas amostras. DM43 também mostrou-se eficaz na inibição destas metaloproteases, como mostra a figura 5B.

III.7- Marcação de componentes da matriz extracelular

Nossos experimentos de marcação de componentes da MEC em fibroblastos demonstraram o depósito de fibronectina, mais evidenciado na maior dose do tratamento com DM43 (1000ng/mL) (figura 6). Os outros componentes de matriz testados (laminina e colágeno IV) não apresentaram modificação com nenhuma dose do tratamento (figuras 7 e 8).

III.8- Adesão celular e bloqueio

De acordo com os resultados do aumento de depósito de fibronectina utilizando o tratamento com DM43, decidimos verificar a adesão celular de tímócitos sobre fibroblastos. O aumento na adesão foi

evidenciado por microscopia óptica das células coradas por Giemsa (figura 9).

De acordo com o índice de adesão empregado, foi verificado um aumento em relação ao controle de 1,6; 3,1 e 2,7x, respectivamente, utilizando as doses de tratamento com DM43 (figura 10).

O bloqueio da adesão utilizando o anticorpo anti-fibronectina antes da adição dos timócitos, resultou na diminuição do índice de adesão à valores basais (figura 10).

III.9- Análise do número de células

Nossos resultados demonstraram uma pequena diminuição na celularidade dos fibroblastos, mais evidenciada na maior dose do tratamento com DM43 (1000ng/mL) (figura 11). Na linhagem MDA, a diminuição é praticamente inexistente utilizando qualquer dose do tratamento (figura 12). Em MCF7, a diminuição é bastante evidente, de forma dose-dependente, ou seja, quanto maior dose de DM43, menor celularidade (figura 13). O gráfico de barras representa 5 experimentos realizados com fibroblastos e 3 com as linhagens tumorais.

III.10- Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular de todas as linhagens avaliadas (fibroblastos e adenocarcinomas de próstata e mama) não demonstrou

nenhum efeito significativo com nenhuma das doses de DM43 utilizadas (figuras 14, 15 e 16). O gráfico de barras representa 5 experimentos realizados com fibroblastos e 3 com as linhagens tumorais.

III.11- Análise da morte celular

A morte celular analisada com o marcador de DNA, 7AAD, demonstrou um aumento da porcentagem em média de 1,7%, em fibroblastos. Todas as doses do tratamento com DM43 foram capazes de induzir morte (figura 17A). Na linhagem tumoral de MDA não foi evidenciada esta tendência, pois nenhuma dose de DM43 foi capaz de induzir morte celular (figura 18A). Já na linhagem de MCF7, DM43 foi capaz de induzir morte de forma dose-dependente (1,2% com 10ng/mL; 1,4% com 250ng/mL e 1,9% com 1000ng/mL do tratamento) (figura 19A). Utilizando a análise da viabilidade absoluta, onde levamos em consideração a celularidade total (100%), verificamos uma diminuição nas células viáveis em relação ao controle de 1,4%, 2,8% e 6,3%, respectivamente com as 3 doses de tratamento com DM43 (figura 19 B). O gráfico de barras representa 5 experimentos realizados com fibroblastos e 3 com as linhagens tumorais.

Considerando a homologia estrutural existente entre SVMPs, ADAMs e MMPs decidimos investigar a possível atividade inibitória de DM43 sobre estas metaloproteases, sabidamente envolvidas em diversas patologias.

Apesar de não existir nenhuma homologia estrutural entre a DM43 e os TIMPs, inibidores naturais das MMPs, estes inibidores se assemelham no mecanismo de ação, uma vez que inibem especificamente metaloproteases e não sofrem nenhuma clivagem durante a interação com a enzima. Além disto, a inibição envolve a formação de complexos não-covalentes, com estequiometria de interação de 1:1 (mol:mol) com as enzimas.

Com o objetivo de verificarmos a interação e a inibição de metaloproteases pela DM43, utilizamos uma linhagem celular normal de fibroblastos, que secretam componentes da matriz extracelular, principalmente MMPs; duas linhagens tumorais humanas, notadamente super produtoras de MMPs, de acordo com a própria

característica da doença; e por último o líquido sinovial de pacientes com osteoartrite, que como já foi mostrado, trata-se de uma doença degenerativa com intensa participação de metaloproteases.

As linhagens tumorais humanas foram escolhidas de acordo com o grau de importância que representam na clínica médica, como veremos a seguir.

O câncer de mama apresenta elevada incidência e mortalidade em todo o mundo, representando um grave problema de saúde pública. A incidência desta neoplasia vem aumentando nas últimas décadas, em grande parte devido às mudanças nos hábitos de vida e no perfil epidemiológico da população. Ele é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, e de longe, o mais freqüente entre as mulheres, sendo que possivelmente houve 1,05 milhão de novos casos no ano de 2000, significando 22% de todos os casos de câncer (Paulinelli *et al.*, 2003).

Utilizando os dados dos Registros de Câncer de Base Populacional de várias cidades, o Ministério da Saúde estimou, que no Brasil, no ano de 2001, foram registrados 305.330 casos novos e 117.550 óbitos por câncer. No sexo feminino, quando observado separadamente, seriam 154.880 casos e 54.220 óbitos, sendo que

31.590 casos e 8.670 óbitos, devidos ao câncer de mama (Paulinelli *et al.*, 2003).

A maioria dos cânceres de mama desenvolvem-se no tecido glandular, sendo classificado como adenocarcinoma. Os adenocarcinomas são tumores malignos do tecido epitelial glandular. Podem originar-se em qualquer órgão que tenha este tipo de tecido, sendo que os mais freqüentes são os adenocarcinomas de mama, próstata, cólon e dos pulmões.

O adenocarcinoma de próstata é a neoplasia interna mais freqüente no homem, sendo a segunda causa de óbito por tumor nos EUA e a terceira causa de óbito por neoplasias no Brasil. Nos EUA, o National Cancer Institute estimou para 2000, 180.400 novos casos com aproximadamente 31.900 mortes causadas pela doença, sendo que no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estimou, para 1999, 14.500 casos novos com uma projeção de 5.000 mortes pela doença (Antonopoulos *et al.*, 2001).

Os sobrenadantes de todas as linhagens celulares utilizadas (fibroblastos e adenocarcinomas de mama e próstata) foram precipitados com sulfato de amônio para concentrar proteínas e retirar o meio (DMEM) onde foram cultivadas. O material concentrado e dialisado, assim como o líquido sinovial, foram submetidos à cromatografia de afinidade acoplada covalentemente com DM43. É

importante ressaltar que todas as amostras foram previamente submetidas à ativação utilizando o composto mercúrico APMA (acetato 4-aminophenyl mercúrico), para garantir a ativação das enzimas. Este composto induz a perturbação molecular do zimogênio, que resulta em sua conversão para uma forma intermediária, até sua forma ativa (Nagase et al., 1990).

Como vimos, a interação foi evidenciada a 280nm pela presença de um pico protéico ligado à coluna, o que sugere a ligação de metaloproteases à DM43.

A análise por SDS-PAGE a 12,5% do material eluído com tampão glicina/HCl, demonstrou a presença de bandas protéicas de aproximadamente 67 e 94 kDa (principais), que podem indicar a presença das MMPs 2 e 9, respectivamente. Outras 3 bandas menos intensas aparecem na região entre 43 e 30 kDa, que podem ser referentes às formas ativas ou intermediárias de MMP-3. Os perfis eletroforéticos de todas as amostras mostraram-se muito semelhantes.

Por zimografia, utilizando gelatina copolimerizada à acrilamida, verificamos a natureza proteolítica de todas as frações, onde foram observados sítios de proteólise ao longo de toda extensão do gel (35,5 -113 kDa), em todos os materiais testados. As amostras apresentam degradação intensa na faixa entre 50,3 e 93 kDa, nestas regiões estão localizadas as formas ativas das MMPs 2 e 9 (\cong 65 kDa), as formas pró destas MMPs (130, 92 e 72 kDa) também aparecem, porém, em menores proporções. Nas raias 3 e 4, referentes a MMCF7 e MLSO observamos degradação um pouco abaixo de 50,3 kDa, que pode indicar a presença da forma ativa de MMP-3 (45 kDa).

A zimografia é uma técnica bastante utilizada para analisar preparações enzimáticas, no caso das MMPs, que são secretadas como zimogênios e tornam-se ativas durante o processo de renaturação após a corrida eletroforética (Leber e Balkwill, 1997).

Não é um fato singular as pró-MMPs interagirem com DM43, já que foi demonstrado que os TIMPs também são capazes de fazê-lo.

Pró-MMP2 liga-se aos TIMPs 2 e 4; enquanto pró-MMP9 liga-se a TIMP-1; estes complexos são formados pela interação específica dos domínios C-terminal de ambos. Como o domínio N-terminal do TIMP (responsável pela atividade inibitória) está livre, este complexo (pró-MMP-TIMP) pode inibir MMPs ativas (Woessner e Nagase, 2000).

De acordo com as massas moleculares identificadas por SDS-PAGE, e com os dados da literatura, deduzimos a possível presença das MMPs 2, 3 e 9 nas amostras, que foram posteriormente confirmadas por imunorevelação, utilizando anticorpos monoclonais.

A MMP-2, também conhecida como gelatinase A, possui massa molecular de 72 kDa (EC 3.4.24.24), e como todas as MMPs é secretada como zimogênio (progelatinase A). O processo de ativação desta enzima por compostos mercúricos, como o APMA utilizado, ou por agentes caotrópicos, gera um intermediário de 66 kDa (Yu *et al.*, 1998). De acordo com os nossos dados de imunorevelação esta foi a forma que ligou-se a DM43.

O tratamento da Pró-MMP-3 com APMA resulta numa enzima que passa por muitos intermediários (Woessner e Nagase, 2000). Se a incubação da forma Pró ocorrer a 55° C, gera a formação de uma forma

ativa de 45 e outra de 28 kDa concomitantemente. MMP-3 (EC 3.4.24.17) não pode ativar seu próprio zimogênio, apesar de estar envolvida na ativação das Pró-MMPs 8, 9 e 13 (Nagase, 1998). Em nossos experimentos detectamos bandas protéicas imunoreveladas por anticorpo monoclonal anti-MMP-3 com massas moleculares de \cong 60 (em todas as frações testadas) e 90 kDa (em MMDA e MMCF7). Vale ressaltar que neste experimento as frações foram preparadas sem agente redutor, como sugerido pelo fabricante do anticorpo utilizado. Outras formas de menores massas também foram detectadas (abaixo de 50,3 kDa), porém sem a menor dúvida as formas pró estão em maiores proporções.

A gelatinase-B, (MMP-9) (EC 3.4.24.35) também identificada, tem a capacidade de degradar colágeno nativo tipo IV e V e gelatina, porém não possui atividade contra colágeno tipo I, proteoglicanos ou laminina. A enzima de 92kDa é geralmente secretada da maioria das células como um complexo com TIMP-1, que inibe sua atividade. A ativação da MMP-9 por APMA resulta primeiramente na clivagem do

peptídeo N-terminal, formando um intermediário de 83kDa, após uma clivagem no C-terminal, dá origem a uma enzima de 67kDa, ambas com atividades similares (Okada et al., 1992). Nossos dados mostram a presença da forma ativa de $\cong 67$ kDa em todas as amostras, porém, nas amostras MMDA e MMCF7 observamos a presença de outras formas moleculares. A presença das diferentes formas de MMP-9 pode sugerir a presença de formas intermediárias ou inativas da proteína, que pode até aparecer em triplete (92,130 e 225 kDa) (Makowski e Ramsby, 2003).

A atividade das enzimas e inibições foram demonstradas por ensaios utilizando a fibronectina como substrato. Após ensaio utilizando diferentes concentrações das enzimas (como parâmetro utilizamos leitura a 280nm), foi escolhida a concentração de material capaz de degradar as cadeias da fibronectina integralmente (10 μ L de ambos materiais). Os ensaios de inibição revelaram a presença de metaloproteases em todas as frações, já que a degradação foi inibida quando utilizamos ortofenantrolina, um inibidor específico destas

proteases. O uso de DM43 neste ensaio demonstrou sua capacidade de não só interagir com MMPs, mas também de inibir suas atividades enzimáticas, mantendo intacta as cadeias de fibronectina.

DM 43 também foi capaz de induzir acúmulo de componente da matriz extracelular (especificamente da fibronectina), levando a um conseqüente aumento de adesão celular (com ápice em 250ng/mL do inibidor). Considerando que as MMPs 2, 3 e 9 tenham como substrato comum a fibronectina (Murphy *et al.*, 2002); (Smith *et al.*, 2002), era de se esperar o acúmulo deste componente com a inibição destas MMPs por DM43. Demonstramos também que, o bloqueio com anticorpo anti-fibronectina, foi capaz de reduzir a adesão para valores basais.

Para verificarmos outras funções atribuídas à DM43, utilizamos alguns protocolos já descritos para os TIMPs, que baseavam-se em modelos de análise do número de células, ciclo e morte utilizando fibroblastos e células tumorais, como ferramentas.

Demonstramos que DM43 foi capaz de causar diminuição no número de fibroblastos (mais evidenciada utilizando a maior dose de DM43) e na linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama (de forma dose dependente). Esta diminuição poderia ser causada ou por alteração no ciclo celular, ou por indução de morte. Foi verificado, que o ciclo de nenhuma das linhagens celulares estudadas foi alterado, no entanto, a morte celular foi aumentada em quase 2x em fibroblastos, e em quase 7x em MCF7, mais uma vez de forma dose dependente. A indução no aumento de morte nesta linhagem, sugere uma especificidade do inibidor,

já que este não foi capaz de induzir nenhuma modificação na linhagem tumoral de adenocarcinoma de próstata.

TIMP-3 é o único membro entre os inibidores endógenos capaz de induzir morte celular por apoptose, em vários tipos de linhagens tumorais. O mecanismo está relacionado com a proteção do receptor de TNF- α (p55) da clivagem proteolítica por MMPs que, intacto, transduz o sinal de morte (Smith *et al.*, 1997); (Baker *et al.*, 1999). Corroborando, Bond e colaboradores, construíram um mutante de TIMP-3, modificando um resíduo de cisteína por uma serina de seu domínio N-terminal, que participa diretamente da inibição das MMPs. Observou-se a perda completa da capacidade de inibir MMP-2, além da perda da capacidade na indução de apoptose (Bond *et al.*, 2000).

A apoptose é um processo de morte ativo, fisiológico, onde uma cascata de sinais intracelulares, dependentes da ativação gênica e síntese protéica, acaba por levar a célula à morte. Hoje, sabe-se que milhões de células sofrem apoptose diariamente no homem adulto. O despertar para este novo tipo de morte revelou a sua participação na manutenção da homeostasia do indivíduo. Uma característica importante deste tipo de morte celular é o fato de não ocorrer lise de membrana, que, conseqüentemente, acarreta a ausência de uma resposta inflamatória secundária. Ao receber o sinal de morte, a célula em processo de apoptose passa a apresentar mudanças morfológicas bem características (diminuição do volume celular; ausência de lise na membrana plasmática; colapso no potencial de membrana da mitocôndria, levando a abertura de poros que liberam proteínas pró-apoptóticas; condensação da cromatina; ativação de enzimas capazes de

clivar o DNA em pequenos fragmentos e formação de corpos apoptóticos (De Meis e Alves, 2004, no prelo).

Defeitos na regulação da apoptose estão associados a diversas doenças ainda sem terapias adequadas, tanto pelo excesso de morte (isquemias; doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson's; osteoartrite, entre outras), quanto pela ausência (câncer, doenças autoimunes e etc.). Por isso, o crescente interesse em estratégias terapêuticas para modular as moléculas-chave que decidem entre a vida-ou-morte das células (Reed, 2002).

No caso específico do câncer, algumas terapias utilizadas são capazes de alguma forma, de induzir apoptose nas células tumorais, como quimioterapia, radioterapia e hipertermia, já que o escape da vigilância do sistema imune configura a rápida progressão de cânceres humanos (Obeid e Hannun, 1999).

Neste trabalho, utilizamos também como ferramenta, o líquido sinovial de pacientes com osteoartrite, que como já vimos, é uma doença caracterizada pela degeneração da cartilagem articular.

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado, composto por células, os condrócitos, e um conjunto de macromoléculas, como o colágeno e os proteoglicanos. O colágeno é uma proteína fibrilar que garante resistência ao tecido, enquanto os proteoglicanos têm a função de mola biológica, sendo responsáveis pela compressibilidade da cartilagem. Os proteoglicanos são formados por vários elementos organizados numa complexa arquitetura aniônica, sua unidade básica são os glicosaminoglicanos (GAG), altamente sulfatados. Estes são ligados a uma proteína central por ligações covalentes, formando

complexos denominados agrecanos. No decorrer da doença, a degradação do agrecano na cartilagem é atribuída a aumento da clivagem proteolítica (Malfait *et al.*, 2002).

Como foi demonstrado neste estudo, proteínas do líquido sinovial de pacientes com osteoartrite, identificadas como MMPs- 2, 3 e 9, foram capazes de interagir com a DM43. A inibição destas enzimas foi evidenciada por ensaio caseinolítico, já que neste processo patológico a MMP-3 é a enzima mais expressa (dentre as 3 identificadas), e de acordo com a literatura, a caseína é melhor substrato para esta enzima (Fisher e Werb, 1995). De acordo com os nossos resultados, foi observada uma intensa degradação provavelmente provocada, pelo menos parcialmente, pelas MMPs presentes no líquido sinovial, que foi totalmente inibida incubado-as previamente com o soro de gambá (que contém a DM43).

Até hoje, há controvérsias sobre a principal enzima envolvida nesta doença, alguns grupos apontam as ADAMs como principal alvo terapêutico de inibição (Malfait *et al.*, 2002), enquanto outros, defendem a utilização de inibidores de metaloproteases para impedir o processo de degradação (Murphy *et al.*, 2002), já que as MMP-8 e MT1-MMP também são capazes de degradar o agrecano (Büttner *et al.*, 1998). Outros grupos concordam que o ideal seria o uso de um inibidor de amplo espectro, que inibisse ambas metaloproteases (Conway *et al.*, 2001).

Uma das primeiras demonstrações da atividade antitumoral de inibidores sintéticos de MMPs foi com o uso em fibrosarcomas humanos, para bloquear a invasão pela reconstituição da membrana basal (Reich *et al.*, 1988). Contudo, a grande descoberta da atividade anti-tumoral foi proposta por Strauch em 1972, que escreveu que “...pela redução da proporção de colágeno degradado e com simultânea estimulação da biosíntese de colágeno, o corpo pode ser capaz de “encapsular” o tumor em estruturas de colágeno e isolá-lo dos tecidos adjacentes, que ainda não foram afetados. Com isto, a invasão e a metástase poderiam ser limitadas, e a remoção cirúrgica ou destruição do tumor primário poderia ser viável.”(Brown, 1998).

Atualmente, o uso de inibidores de MMPs vem sendo muito difundido, devido ao aumento de doenças correlacionadas com estas enzimas, juntamente com o enorme interesse da indústria farmacêutica (Brown, 1998). Em particular, no caso de câncer, o uso destes inibidores representa uma diferença fundamental nos tratamentos convencionais. Os inibidores de MMPs e alguns agentes antiangiogênicos agem essencialmente em outro componente da malignidade, o estroma. O estroma tumoral, incluindo vasculatura, participa intensamente no processo de crescimento, invasão e espalhamento da doença. Além disto, este alvo tem menos chance de evadir o tratamento do que o tumor propriamente dito (Brown, 1998).

Para inibir o crescimento e metástase de tumores muitos esforços foram empregados no desenvolvimento de inibidores de metaloproteases, que agissem na angiogênese. Dentre os inibidores naturais, os TIMPs e a

α_2 -macroglobulina poderiam ser bons candidatos, se não fosse a curta meia-vida que apresentam (Klein *et al.*, 2004), além da multiplicidade de funções desempenhadas pelos TIMPs que poderiam ser prejudiciais em terapias anti-câncer (Duffy *et al.*, 2000).

Em relação aos inibidores sintéticos, estes podem ser subdivididos em 4 grupos farmacológicos:

(1) Peptídeos baseados na estrutura do colágeno que são sintetizados com estrutura baseada no sítio de clivagem e ligação à MMPs de diferentes colágenos. Deste grupo dois inibidores destacam-se: Batimastate, primeiro inibidor utilizado por pacientes com câncer, cujos testes clínicos foram interrompidos após o desenvolvimento de Marimastate, cujos testes são de difícil interpretação.

(2) Baseados na estrutura cristalina do sítio ativo das MMPs, veio para resolver o problema de especificidade do grupo anterior. Dois destes inibidores, Prinomastate (AG3340) e BAY12-9566, foram sintetizados para inibir especificamente MMPs 2 e 9. BAY12-9566, em estudos pré-clínicos *in vivo*, demonstrou ser eficaz em reduzir a angiogênese e inibir a formação de metástase em modelos murinos. Apesar disto, em 1999, os testes de fase III foram interrompidos, já que os pacientes que receberam este medicamento tiveram uma menor sobrevida, em relação ao grupo controle. Prinomastate, também teve seus testes de fase III interrompidos em 2000, devido a falta de eficiência em pacientes com estágios avançados de câncer.

Existem algumas razões conhecidas para o fracasso do uso destes inibidores na clínica. Ambos foram desenhados para serem inibidores específicos de MMPs 2 e 9 e sabe-se que esta inibição não é suficiente para “frear” o processo tumoral.

Discuti-se também, o desenho experimental dos testes utilizados para os inibidores de MMPs, que parecem subestimar os potenciais efeitos destes medicamentos (Klein *et al.*, 2004).

(3) Derivados de tetraciclinas que inibem a atividade e a produção das MMPs. Como exemplo, podemos citar o Col-3, que foi utilizado em várias linhagens tumorais, onde foi capaz de inibir a expressão das MMPs 2 e 9, além de inibir proliferação, invasão, crescimento tumoral e metástase, em modelos de câncer de próstata (Lokeshwar *et al.*, 2002).

(4) Bisfosfonados, o mecanismo de inibição destes inibidores ainda não foi totalmente elucidado, porém já foi demonstrado seu uso para inibição de várias atividades das MMPs. Deste grupo, o composto mais conhecido é o Clodronato, que possui a capacidade de inibir a expressão do RNAm, diminuindo os níveis protéicos de MT1-MMP em células de fibrosarcomas (Hidalgo e Eckhardt, 2001).

Finalmente não podemos deixar de destacar o uso de inibidores não-convencionais, como o Neovastate (AE-941), um extrato de cartilagem de tubarão que inibe MMPs, mostrando um efeito anti-angiogênico em animais de experimentação. Na fase III de testes, está sendo utilizado em tumores renais (Falardeau *et al.*, 2001). Além disto, um componente do chá verde, também na fase III dos testes, está sendo utilizado como inibidor *in vitro* das MMPs-2 e 9 (Garbisa *et al.*, 1999). Finalmente, o ácido acetilsalicílico, que reduz o risco de câncer de cólon, não só pela diminuição da inflamação, afetando o desenvolvimento do

câncer mas, diretamente, inibindo a atividade da MMP-2, decrescendo a invasão *in vitro* (Jiang *et al.*, 2001).

Os testes clínicos utilizando inibidores de MMPs em osteoartrite falharam por apresentarem efeitos colaterais na musculatura esquelética, como mialgia e tendinites. Camundongos deficientes em MT1-MMP não só desenvolveram dwarfismo e osteopenia, como também desenvolveram sintomas da própria artrite, demonstrando a fundamental participação de MMPs no remodelamento tecidual normal (Murphy *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que esta é a primeira vez que é demonstrada a capacidade de DM43, um típico inibidor de metaloproteases de veneno de serpentes, em inibir outra subfamília de metaloproteases. Nossos dados experimentais demonstram a potencialidade de DM43 em inibir MMPs, que estão envolvidas em diversas patologias, sem terapias adequadas até o momento.

Com a concessão de patente no Brasil dos efeitos obtidos para DM43 (nº BRPI0400284-9), surge uma esperança no desenvolvimento de uma nova terapia antitumoral, bem como uma terapêutica adequada para pacientes com osteoartrite.

DM43 mostrou-se capaz de:

-interagir e inibir as MMPs 2, 3 e 9 presentes em linhagens estromais, tumorais e do líquido sinovial de pacientes com osteoartrite;

- aumentar o depósito de fibronectina, e conseqüentemente, a adesão celular.

- reduzir o numero de células estromais e tumorais ;

-induzir morte celular em células estromais e tumorais;

- 1- Agrez, M., Chen, A., Cone, R.I., Pytela, R. e Sheppard, D. (1994). The alphaVbeta6 integrin promotes proliferation of colon carcinoma cells through a unique region of the beta6 cytoplasmic domain. *The Journal of Cell Biology*, 127(2), 547-556.
- 2- Ahonen, M., Baker, A.H. e Kähäri, V.M. (1998). Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Research*, 58, 2310-2315.
- 3- Airola, K., Karonen, T., Vaalamo, M., Lehti, K., Lohi, J., Kariniemi, A., Keski-Oja, J. e Saarialho-Kere, U.K. (1999). Expression of collagenase-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *British Journal of Cancer*, 80(5/6), 733-743.
- 4- Ala-Aho, r., Johansson, N., Baker, A.H. e Kähäri, V.M. (2002). Expression of collagenase-3 (MMP-13) enhances invasion of human fibrosarcoma HT-1080 cells. *International Journal of Cancer*, 97, 283-289.
- 5- Antonopoulos, I.M., Pompeo, A.C.L., El Hayek, O.E., Sarkis, A.S., Alfer Junior, W. e Arap, S. (2001). Results of prostate cancer screening in non-symptomatic men. *Brazilian Journal of Urology*, 27(3), 227-234.
- 6- Baker, A.H., George, S.J., Zaltsman, A.B., Murphy, G. e Newby, A.C. (1999). Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *British Journal of Cancer*, 79(9-10), 1347-1355.
- 7- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. e Hanahan, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 737-744.

- 8- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. e Cerretti, D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- alpha from cells. *Nature*, 385(6618), 729-733.
- 9- Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P. e White, J.M. (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*, 356(6366), 248-252.
- 10- Blundel, T.L. (1994). Metalloproteinase superfamilies and drug design. *Nature Structure Biological*, 1, 73.
- 11- Bond, M., Murphy, G., Bennett, M.R., Amour, A., Knäuper, V., Newby, A.C. e Baker, A.H. (2000). Localization of the death domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 to the N terminus. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 41358-41363.
- 12- Brew, K., Dinakarandian, D. e Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477, 267-283.
- 13- Brown, P.D. (1998). Synthetic inhibitors of matrix metalloproteinases. In R.P. Mecham (Ed.), *Matrix metalloproteinases*: Academic Press.
- 14- Büttner, F.H., Hughes, C.E., Margerie, D., Lichte, A., Tschesche, H., Caterson, B. e Bartnik, E. (1998). Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan

substrate rAgg1mut at the 'aggrecanase' and the MMP sites.
Biochemical Journal, 333, 159-165.

- 15- Chang, C. e Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology*, 11(11), S37-S43.
- 16- Chippaux, J.P. (1998). Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin World Health Organ*, 76(5), 515-524.
- 17- Conway, J.G., Andrews, R.C., Beaudet, B., Bickett, D.M., Boncek, V., Brodie, T.A., Clark, R.L., Crumrine, R.C., Leenitzer, M.A., Mcdougald, D.L., Han, B., Hedeem, K., Lin, P., Milla, M., Moss, M., Pink, H., Rabinowitz, M.H., Tippin, T., Scates, P.W., Selph, J., Stimpson, S.A., Warner, J. e Becherer, J.D. (2001). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and arthritis in the rat by GW3333, a dual inhibitor of TNF-alpha-converting enzyme and matrix metalloproteinases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 900-908.
- 18- Cornelius, L.A., Nehring, L.C., Harding, E., Bolanowski, M., Welgus, H.G., Kobayashi, D.K., Pierce, R.A. e Shapiro, S.D. (1998). Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *The Journal of Immunology*, 161, 6845-6852.
- 19- Coussens, L.M. e Werb, Z. (2001). Inflammatory cells and cancer: think different! *Journal of Experimental Medicine*, 193(6), F23-F26.
- 20- Coussens, L.M., Fingleton, B. e Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, 295, 2387-2392.
- 21- Curran, S. e Murray, G.I. (2000). Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *European Journal of Cancer*, 36, 1621-1630.

- 22- De Clerck, Y.A. (2000). Interactions between tumours cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *European Journal of Cancer*, 36, 1258-1268.
- 23- Deryugina, E.I., Bourdon, M.A., Luo, G., Reisfeld, R.A. e Strongin, A. (1997). Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. *Journal of Cell Science*, 110, 2473-2482.
- 24- De Meis, J. e Alves, L.A. (2004, no prelo). Apoptose, *Então é assim? Aulas Práticas de Imunologia*: Ateneu.
- 25- Dong, Z., Kumar, R., Yang, X. e Fidler, I.J. (1997). Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostation in lewis lung carcinoma. *Cell*, 88, 801-810.
- 26- Duffy, M.J., Maguire, T.M., Hill, A., McDermott, E. e O'Higgins, N. (2000). Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Research*, 2, 252-257.
- 27- Egeblad, M. e Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews*, 2, 163-176.
- 28- Enghild, J.J., Salvesen, G., Brew, K. e Nagase, H. (1989). Interaction of human rheumatoid synovial collagenase (matrix metalloproteinase 1) and stromelysin (matrix metalloproteinase 3) with human alpha2- macroglobulin and chicken ovostatin. Binding kinetics and identification of matrix metalloproteinase cleavage sites. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 8779-8785.
- 29- Falardeau, P., Champagne, P., Poyet, P., Hariton, C. e Dupont, E. (2001). Neovastat, a naturally occurring multifunctional

antiangiogenic drug, in phase III clinical trials. *Semin. Oncology*, 28(6), 620-625.

- 30- Fisher, S.J. e Werb, Z. (1995). The catabolism of extracellular matrix components. In M.A. Haralson, & J.R. Hassell (Eds.), *Extracellular matrix*: PAS.
- 31- Fuchs, S., Skwara, A., Bloch, M. e Dankbar, B. (2004). Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *OsteoArthritis and Cartilage*, No prelo, 1-10.
- 32- Garbisa, S., Biggin, S., Cavallarin, N., Sartor, L., Benelli, R. e Albini, A. (1999). Tumor invasion: molecular shears blunted by green tea. *Nature Medicine*, 5(11), 1216.
- 33- Goldsby, R.A., Kindt, T.J. e Osborne, B.A. (2002). Cancer and immune system, *Immunology*: Freeman, .pp.539-560.
- 34- Gomis-Rüth, F.X. (2003). Structural aspects of the Metzincin clan of metalloendopeptidases. *Molecular Biotechnology*, 24, 157-202.
- 35- Gorelik, L. e Flavell, R.A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nature Medicine*, 7(10), 1118-1122.
- 36- Guedez, L., Courtemanch, L. e Stetler-Stevenson, M. (1998a). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood*, 92(4), 1342-1349.
- 37- Guedez, L., Stetler-Stevenson, W.G., Wolff, L., Wang, J., Fukushima, P., Mansoor, A. e Stetler-Stevenson, M. (1998b). In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Journal of Clinical Investigation* 102(11), 2002-2010.

- 38- Gutiérrez, J.M. e Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 82, 841-850.
- 39- Hanemaaijer, R., Verheijen, J.H., Maguire, T.M., Visser, H., Toet, K., McDermott, E., O'Higgins, N. e Duffy, M.J. (2000). Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. *International Journal of Cancer*, 86(2), 204-207.
- 40- Hawgood, B.J. (1995). Abbé Felice Fontana (1730-1805): founder of modern toxinology. *Toxicon*, 33(5), 591-601.
- 41- Hidalgo, M. e Eckhardt, S.G. (2001). Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(3), 178-193.
- 42- Hinton, R., Moody, R.L., Davis, A.W. e Thomas, S.F. (2002). Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations. *American Family Physician*, 65(5), 841-848.
- 43- Hite, L.A., Jia, L.G., Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. (1994). cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Archieve Biochemistry Biophysica.*, 308(1), 182-191.
- 44- Hua, J. e Muschel, R.J. (1996). Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Research*, 56, 5279-5284.
- 45- Janusz, M.J., Bendele, A.M., Brown, K.K., Taiwo, Y.O., Hsieh, L. e Heitmeyer, S.A. (2002). Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: inhibition of joint damage by a

matrix metalloproteinase inhibitor. *OsteoArthritis and Cartilage*, 10, 785-791.

- 46- Jiang, M., Liao, C. e Lee, P. (2001). Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits *in vitro* invasion of tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 671-677.
- 47- Klein, G., Vellenga, E., Fraaije, M.W., Kamps, W.A. e de Bont, E.S.J.M. (2004). The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 50, 87-100.
- 48- Kurschat, P. e Mauch, C. (2000). Mechanisms of metastasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 25, 482-489.
- 49- Lambert, E., Dassé, E., Haye, B. e Petitfrère, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 49, 187-198.
- 50- Leber, T.M. e Balkwill, F.R. (1997). Zymography: a single-step staining method for quantification of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry*, 249, 24-28.
- 51- Lohmander, L.S., Hoerrner, L.A. e Lark, M.W. (1993). Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 36(2), 181-189.
- 52- Lokeshwar, B.L., Selzer, M.G., Zhu, B., Block, N.L. e Golub, L.M. (2002). Inhibition of cell proliferation, invasion, tumor growth and metastasis by an oral non-antimicrobial tetracycline analog (COL-3) in a metastatic prostate cancer model. *International Journal of Cancer*, 98, 297-309.

- 53- Makowski, G.S. e Ramsby, M.L. (2003). Zymography analysis and activated forms of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection. *Clinica Chimica Acta*, 329, 77-81.
- 54- Makowski, G.S. e Ramsby, M.L. (2003). Zymography analysis and activated forms of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection. *Clinica Chimica Acta*, 329, 77-81.
- 55- Malfait, A.M., Liu, R.Q., Ijiri, K., Komiya, S. e Tortorella, M.D. (2002). Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22201-22208.
- 56- Malfait, A.M., Liu, R.Q., Ijiri, K., Komiya, S. e Tortorella, M.D. (2002). Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22201-22208.
- 57- Mañes, S., Llorente, M., Lacalle, R.A., Gómez-Moutón, C., Kremer, L., Mira, E. e Martínez-A, C. (1999). The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 6935-6945.
- 58- Matsui, T., Fujimura, Y. e Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477, 146-156.
- 59- Mebs, D. (1998). Phospholipases A₂ that show myotoxic activity. In G.S. Bailey (Ed.), *Enzymes from Snake Venoms*. Fort Collins: Alaken, Inc.
- 60- Moussatché, H. e Daló, N. (1978). Acción tóxica de las plantas del género Ipomoeas, *Rev. Univ. Centro Occ. (Tarea Comúm)* (pp. 25-39).

- 61- Moussatché, H. e Melendez, T. (1979). Some pharmacological observations with Elapidae and Crotalidae snake venoms in the guinea-pig denervated diaphragm. On the specificity of the cholinergic blockade by their venoms. *Revista Brasileira de Biologia*, 39(3), 605-610.
- 62- Moussatché, H., Yates, A., Leonardi, F. e Borchel, L. (1980). Obtencion de una fraccion del suero de *Didelphis* activa contra la accion toxica del veneno de *Bothrops jararaca*, *XXX Convencion anual de AsoVAC*.
- 63- Moussatché, H., Leonardi, F. e Mandelbaum, F.R. (1981). Inhibition por una proteina aislada del suero de *D. Marsupialis* a la accion hemorragica por una fraccion del veneno de *bothrops jararaca*. *Acta Científica Venezolana*, 32.
- 64- Moussatché, H. e Daló, N. (1982). Hamster stomach as an isolated preparation for bradykinin assays. *Journal of Pharmacology*, 34(8), 542.
- 65- Murphy, G., Knäuper, V., Atkinson, S., Butler, G., English, W., Hutton, M., Stracke, J. e Clark, I. (2002). Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Research*, 4(3), S39-S49.
- 66- Nagase, H., Enghild, J.J., Suzuki, K. e Salvesen, G. (1990). Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. *Biochemistry*, 29, 5783-5789.
- 67- Nagase, H. (1998). Stromelysins 1 and 2. In R.P. Mecham (Ed.), *Matrix metalloproteinases*: Academic Press, pp. 43-68.
- 68- Nagase, H. e Woessner, J., J. F. (1999). Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21491-21494.

- 69- Nagase, H. e Brew, K. (2002). Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potentials therapeutics. *Arthritis Research*, 4(3), S51-S61.
- 70- Neves-Ferreira, A.G.C., Cardinale, N., Rocha, S.L.G., Perales, J. e Domont, G.B. (2000). Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. *Biochimica Biophysica Acta*, 1474(3), 309-320.
- 71- Neves-Ferreira, A.G.C., Perales, J., Fox, J.W., Shannon, J.D., Makino, D.L., Garratt, R.C. e Domont, G.B. (2002). Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum, *Journal of Biological Chemistry*, pp. 13129-13137.
- 72- Nguyen, M., Arkell, J. e Jackson, C.J. (2001). Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33, 960-970.
- 73- Obeid, L.M. e Hannun, Y.A. (1999). Apoptosis and senescence of hematopoietic and immune cells: mechanisms and significance. In J.I. Gallin, & R. Snyderman (Eds.), *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (pp. 819-831): Philadelphia.
- 74- O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. e Folkman, J. (1997). Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88, 277-285.
- 75- Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K. e Hayakawa, T. (1992). Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of

- the precursor and enzymic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21712-21719.
- 76- Omori-Satoh, T., Yamakawa, Y. e Mebs, D. (2000). The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. *Toxicon*, 38(11), 1561-1580.
- 77- Paulinelli, R.R., Freitas Júnior, R., Curado, M.P. e Almeida e Souza, A. (2003). A situação do câncer de mama em Góias, no Brasil e no mundo:tendências atuais para a incidência e a mortalidade. *Revista brasileira de saúde materno infantil*, 3(1), 17-24.
- 78- Perales, J., Moussatché, H., Marangoni, S., Oliveira, B. e Domont, G.B. (1994). Isolation and partial characterization of an anti-bothropic complex from the serum of South American Didelphidae. *Toxicon*, 32(10), 1237-1249.
- 79- Perales, J. e Domont, G.B. (2002). Are inhibitors of metalloproteinases, phospholipases A₂ and myotoxins members of the innate immune system? In A. Ménez (Ed.), *Perspectives in Molecular Toxinology*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, (pp. 435-456).
- 80- Pfeifer, A., Kessler, T., Silletti, S., Cheresch, D.A. e Verma, I.M. (2000). Suppression of angiogenesis by lentiviral delivery of PEX, a noncatalytic fragment of matrix metalloproteinase 2. *Proceedings of National Academic of Sciences*, 97(22), 12227-12232.
- 81- Philpott, N.J., Turner, A.J., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J.C., Gordon-Smith, E.C., Dalglish, A.G. e Gibson, F.M. (1996). The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood*, 87, 2244-2251.

- 82- Powell, W.C., Fingleton, B., Wilson, C.L., Boothby, M. e Matrisian, L.M. (1999). The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Current Biology*, 9, 1441-1447.
- 83- Qi, Z.Q., Yonaha, K., Tomihara, Y. e Toyama, S. (1995). Isolation of peptides homologous to domains of human alpha 1B-glycoprotein from a mongoose antihemorrhagic factor. *Toxicon*, 33(2), 241-245.
- 84- Reed, J.C. (2002). Apoptosis-based therapies. *Nature Review*, 1, 111-121.
- 85- Reich, R., Thompson, E.W., Iwamoto, Y., Martin, G.R., Deason, J.R., Fuller, G.C. e Miskin, R. (1988). Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells. *Cancer Research*, 48(12), 3307-3312.
- 86- Rocha, S.L., Lomonte, B., Neves-Ferreira, A.G., Trugilho, M.R., Junqueira-de-Azevedo Ide, L., Ho, P.L., Domont, G.B., Gutierrez, J.M. e Perales, J. (2002). Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. *European Journal of Biochemistry*, 269(24), 6052-6062.
- 87- Sheu, B., Hsu, S., Ho, H., Lien, H., Huang, S. e Lin, R. (2001). A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Research*, 61, 237-242.
- 88- Smith, M.R., Kung, H., Durum, S.K., Colburn, N.H. e Sun, Y. (1997). TIMP-3 induces cell death by stabilizing TNF-alpha receptors on the surface of human colon carcinoma cells. *Cytokine*, 9(10), 770-780.

- 89- Smith, R.L. (1999). Degradative enzymes in osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience*, 4, 1-22.
- 90- Smith, M.F., Ricke, W.A., Bakke, L.J., Dow, M.P.D. e Smith, G.W. (2002). Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 191, 45-56.
- 91- Stone, K.L. e Williams, K.R. (1993). Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptide isolation, *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing*: Academic Press.
- 92- Souza, A.P. e Line, S.R.P. (2002). The Biology os matrix metalloproteinases. *Rev.FOB*, 10(1), 1-6.
- 93- Tang, B.L. (2001). ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *International Journal of Biochemical Cell Biology*, 33(1), 33-44.
- 94- Tanjoni, I., Butera, D., Bento, L., Della-Casa, M.S., Marques-Porto, R., Takehara, H.A., Gutiérrez, J.M., Fernandes, I. e Moura-da-Silva, A.M. (2003). Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon*, 42(7), 801-808.
- 95- Valente, P., Fassina, G., Melchiori, A., Masiello, L., Cilli, M., Vacca, A., Onisto, M., Santi, L., Stetler-Stevenson, W.G. e Albini, A. (1998). TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *International Journal of Cancer*, 75(2), 246-253.
- 96- Verzijl, N., Bank, R.A., TeKoppele, J.M. e DeGroot, J. (2003). Ageing and osteoarthritis: a different perspective. *Current Opinion on Rheumatology*, 15(5), 616-622.

- 97- Vindelov, L.L. (1977). Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Archiv B Cell Pathology*, 24(3), 227-242
- 98- Warrell, D.A. (1996). Clinical features of envenoming from snake bites. In M. Goyffon (Ed.), *Envenomings and their treatments* (pp. 63-74). Lyon: Éditions Fondation Marcel Mérieux.
- 99- Woessner, J., J.F. (1998). The matrix metalloproteinase family. In R.P. Mecham (Ed.), *Matrix metalloproteinases*: Academic Press.
- 100- Woessner, J.F. e Nagase, H. (2000). Functions of the TIMPs. In P. Sheterline (Ed.), *Matrix metalloproteinases and TIMPs*: Oxford, pp. 130-135.
- 101- Woessner, J., J.F. (2001). That impish TIMP: the tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(6), 799-800.
- 102- Wu, E., Mari, B.P., Wang, F., Anderson, I.C., Sunday, M.E. e Shipp, M.A. (2001). Stromelysin-3 suppresses tumor cell apoptosis in a murine model. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82, 549-555.
- 103- Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y. e Fujisawa-Sehara, A. (1995). A metalloprotease-desintegrin participating in myoblast fusion. *Nature*, 377, 652-656.
- 104- Yu, A.E., Murphy, A.N. e Stetler-Stevenson, W.G. (1998). 72-kDa gelatinase (gelatinase A): structure, activation, regulation, and substrate specificity. In R.P. Mecham (Ed.), *Matrix metalloproteinases*: Academic Press, pp. 85-106.

105- Yu, Q. e Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development*, 14,163-176.