

Redução de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, por meio de teste wts (warts)

Selma Goulart Furtado

Bacharel em Ciências Biológicas, Monitora Laboratório de Genética pelo
Centro Universitário de Patos de Minas

Júlio César Nepomuceno

Orientador e Professor pelo Centro Universitário de Patos de Minas e Professor adjunto
pela Universidade Federal de Uberlândia

Resumo: O câncer é atualmente uma das principais causas de morte em todo mundo. O quadro atual é caracterizado pela existência de tratamentos de elevado custo e índice terapêutico relativamente reduzido. Há vários produtos farmacêuticos disponíveis de agentes quimioterápicos para tratamento do câncer, mas nenhum deles tem se mostrado eficiente na erradicação de células cancerosas sem afetar tecidos saudáveis adjacentes. Carcinogênese e terapia de câncer são duas vias opostas que podem estar correlacionadas, pois alguns agentes citotóxicos podem causar câncer e serem administrados no tratamento de tumores. O veneno das serpentes representa uma mistura de substâncias biologicamente ativas, sendo formadas por compostos inorgânicos e orgânicos dos quais 90% são proteínas com alto potencial terapêutico e farmacológico, algumas com propriedades antitumorais. As metaloproteases (MPVS) são proteases das peçonhas ofídicas e têm sido demonstradas como ferramentas muito úteis para concepção de processos de adesão entre células e célula-matriz extracelular. A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos tem estimulado estudos na indução e no desenvolvimento de tumores nessas moscas, estudos estes que podem contribuir diretamente para o entendimento de cânceres em seres humanos. Objetivou-se com esta investigação avaliar a redução de tumores epiteliais em *D. melanogaster* pela enzima metaloprotease isolada da peçonha ofídica de *Bothrops pauloensis* utilizando o teste wts (warts). Pelos resultados apresentados é possível atribuir uma ação redutora de tumores pela enzima Metaloprotease (P-I) isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, nos tratamentos analisados em suas maiores concentrações (0,025 mg/mL e 0,0125 mg/mL) por meio do teste wts em *D. melanogaster*.

Palavras-chave: câncer; veneno; moscas; proteínas; enzimas.

Abstract: Cancer is nowadays one of the main causes of death in the whole world. The present situation is characterized by the existence of high-cost treatments of relatively

reduced therapeutic indexes. There are lots of pharmaceutical products available from chemotherapy agents for cancer treatment, but none of them has shown to be efficient in the eradication of cancer cells without affecting healthy adjacent tissues. Carcinogenesis and cancer therapy are two opposed ways that can be correlated, for some cytotoxic agents may cause cancer and be administered in the treatment of tumors. The poison of serpents represents a mixture of biologically active substances, being formed by inorganic and organic compounds, of which 90% are proteins with high therapeutic and pharmacological potential, some of them with anti-tumor properties. The metalloproteases (MPVS) are proteases of ophidian poisons and they have been demonstrated as very useful tools for the conception of processes of adhesion between cells and extra-cellular cell-matrix. The evolutive conservation of suppressor genes of tumor between *Drosophila* and mammals has stimulated studies on the induction and development of tumors in these flies, and these studies may contribute directly for the understanding of cancers in human beings. In this work we aimed at evaluating the reduction of epithelial tumors in *D. melanogaster* by the metalloprotease enzyme isolated from the ophidian poison of *Bothrops pauloensis* using the *wts* test (warts). By the results presented, it is possible to attribute a reducing action of tumors by the metalloprotease enzyme (P-I), isolated from the poison of *Bothrops pauloensis*, in the analyzed treatments in its higher concentrations (0,025 mg/mL e 0,0125 mg/mL) through *wts* test in *D. melanogaster*.

Keywords: cancer; poison; flies; proteins; enzymes.

1. Introdução

O estudo da genética tornou-se fundamental para a compreensão da fisiopatologia das doenças. As funções biológicas das células são controladas a partir da expressão de genes codificadores de proteínas e enzimas funcionais e da ação desses produtos gênicos (LOURO *et al.*, 2002).

Além do mapeamento de genes, os geneticistas moleculares apontaram com precisão os defeitos moleculares subjacentes a algumas importantes doenças genéticas, o que contribuiu significativamente ao entendimento de como os defeitos gênicos causam doenças, facilitando busca de tratamentos e curas (BAMSHAD *et al.*, 2004).

As mutações que ocorrem durante a transcrição são modificações transmitidas no material genético e acontecem em qualquer célula, seja esta da linhagem germinativa ou somática (SNUSTAD; SIMMONS, 2001). Estas acontecem espontaneamente ou por meio de agentes exógenos, denominados agentes mutagênicos (BROWN; MOTTA; BARBOSA, 1999). As mutações são, especialmente, fontes primárias de variabilidade genética nas populações de seres vivos e muitas vezes são responsáveis tanto por doenças genéticas ou hereditárias quanto por diversos casos de tumores (LOURO, *et al.*, 2002).

Neoplasia é uma proliferação celular autônoma, muitas vezes seguida de perda da diferenciação; é uma massa anormal de tecido no qual crescimento e divisão se mostram desordenados se comparados aos tecidos normais, persistindo excessivos mesmo depois de interrompido o estímulo que provocou estas alterações (COSTA, 2005).

Assim, o crescimento independente de tecidos, os quais levam à formação de tumores, escaparam das restrições normais da proliferação celular e exibem graus variáveis de fidelidade aos seus precursores; elas surgem de mutações em genes que regulam o crescimento celular, a apoptose ou a reparação do DNA. Em geral, as neoplasias são irreversíveis e o seu crescimento é, na maioria das vezes, autônomo. O crescimento acelerado do tumor, contraposto à lenta taxa de mortalidade das células cancerosas, resulta no crescimento da massa tumoral (BACURAU; COSTA ROSSA, 1997).

Todos os tumores de células somáticas são ocasionados por muitas mutações especiais que se aglomeram em uma célula. Essas mutações vão infligir às células alta habilidade de proliferação celular, diminuição da suscetibilidade a apoptose ou aumento da taxa geral de mutação da célula (SUZUKI, *et al.*, 2002).

Os proto-oncogenes promovem a proliferação celular ordenada, e a atuação dos genes supressores de tumor mantém essa proliferação restringindo o crescimento celular. Os genes supressores de tumor, juntamente com os proto-oncogenes, atuam na regulação e proliferação celular e são os principais mecanismos de controles genéticos (LOURO, *et al.*, 2002).

As estimativas no Brasil para o ano de 2010/2011 apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tumores mais frequentes, com exceção do de pele do tipo não-melanoma, serão os de próstata e de pulmão no sexo masculino, e os de colo do útero e mama, no sexo feminino. Em 2010, são esperados 236.240 novos casos para os homens e 253.030 para mulheres. Estima-se que o câncer de pele do tipo não-melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido do de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2010).

O quadro atual é caracterizado pela existência de tratamentos de elevado custo e índice terapêutico relativamente reduzido para o cancer.. Há vários produtos farmacêuticos disponíveis de agentes quimioterápicos para tratamento do câncer, mas nenhum deles tem se mostrado eficiente na erradicação de células cancerosas sem afetar tecidos saudáveis adjacentes (SILVA *et al.*, 2007). Carcinogênese e terapia de câncer são duas vias opostas que podem estar correlacionadas, pois alguns agentes citotóxicos podem causar câncer e serem administrados no tratamento de tumores (BLAGOSKLONNY, 2005).

Existem na peçonha ofídica inúmeras proteínas, enzimas e compostos diversos (lipídeos, carboidratos etc) que fazem desta substância uma mistura com alto potencial terapêutico e farmacológico. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a redução do tumor epitelial em *D. melanogaster*, induzido pela Mitomicina C, pela proteína de ação enzimática Metaloprotease, isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, por meio do teste *wts*.

1.1. Serpentes *Bothrops* (jararacas)

As serpentes são animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, Classe Reptilia, Ordem Squamata, subordem Serpentes. São registrados atualmente 2.900 espécies de serpentes em todo mundo distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias

(FRANCO, 2003 *apud* TORRES, 2007). As serpentes da família Viperidae são as que têm o mais complexo aparelho peçonhífero; são solenóglifas ou solinoglifodontes. A família Viperidae se divide em dois grupos: Viperinae e Crotalinae; neste último estão as serpentes de maior importância e ocorrência, sendo as principais responsáveis por acidentes no Brasil (BORGES, 2001). As serpentes botrópicas, popularmente conhecidas como jararacas, podem causar quadros clínicos, tais como miólise sistêmica, coagulopatias, hemorragias, falências e outras desordens renais, cardiotoxicidade e danos teciduais locais (WHITE, 2005). O gênero *Bothrops* engloba, no Brasil, 17 espécies e se distribui por todo território nacional (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

As peçonhas das serpentes são produzidas em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar grande quantidade de substâncias biologicamente ativas, compostas principalmente de proteínas e polipeptídeos (TORRES, 2007). O veneno das serpentes representa uma mistura de substâncias biologicamente ativas, sendo formadas por compostos inorgânicos e orgânicos dos quais 90% são proteínas. Dentre os íons podemos destacar o cálcio, que é um importante cofator da ação de algumas enzimas proteolíticas e das Fosfolipases A₂ (PLA₂); o magnésio e o Zinco que também são importantes íons para a ação de diversas metaloproteases do veneno (JIA *et al.*, 1996 *apud* TOYAMA, 2004). A peçonha é o mais concentrado fluido produzido por um vertebrado, possuindo de 18 a 52% de massa seca, enquanto o suco gástrico possui apenas de 0,5 a 1% (JUNQUEIRA, 2005).

Durante o processo evolutivo das serpentes peçonhentas o aparato digestivo como glândulas salivares e trato pancreático podem ter se diferenciado em um tecido especializado quase exclusivamente na produção de veneno. A saliva e outras secreções gástricas forneceram as bases para a formação da peçonha, tornando o epitélio da glândula peçonhífera com características particulares (JUNQUEIRA, 2005).

O interesse em avaliar peçonha de serpentes como agente antitumoral é relatado desde o início do século passado, quando Calmette, Saenz e Costil (1933) relataram a atividade antitumoral da peçonha de *Naja* sp em células de adenocarcinomas. Daquele momento em diante, uma série de trabalhos têm sido publicados sobre o assunto, e ainda há controvérsias. Segundo Chippaux (1998), a morbidade notificada por serpentes do gênero *Bothrops* é de 15 a cada 100.000 pessoas. Sob a ação das proteínas, especialmente as Fosfolipases A₂ e Metaloproteases, os venenos botrópicos produzem fortes danos em tecidos biológicos e ainda interferem em quase todas as fases da hemostasia humana (HIGUSHI *et al.*, 2007).

A *Bothrops pauloensis* é uma serpente peçonhenta solenóglifa, seu habitat consiste em áreas secas e semi-áridas. Os nomes mais comuns dessa espécie são jararaca e jararaca-pintada (figura 1). Estudos demonstram que *B. pauloensis* é frequentemente encontrada em áreas de atividade agrícola de café e soja, pastagens, reflorestamentos e próxima a fontes de água (VALLE; BRITES, 2008). Sua peçonha apresenta efeitos locais como dor, edema, bolhas, hemorragia, necrose tecidual e algumas ações sistêmicas como distúrbio na coagulação, hemorragia, insuficiência renal aguda (IRA) e, em casos mais severos, choque (CASTANHEIRA *et al.*, s/d).



Figura 1: *Bothrops pauloensis*

1.2. Metaloproteases

As metaloproteases são hidrolases como as endopeptidases, que dependem da ligação de um metal em sua estrutura, que em geral é o zinco, em seu domínio catalítico para a sua atividade enzimática. As metaloproteases variam de filogenia e função, podendo ser encontradas desde bactérias até mamíferos.

Nos venenos das serpentes botrópicas essas enzimas são as principais responsáveis pela ação hemorrágica. Esta hemorragia desencadeada no local da picada é devido a dois eventos importantes: a degradação enzimática da membrana basal e o efeito sobre as células endoteliais nos capilares. Estes eventos causam o deslocamento e lise de células endoteliais, causando sua morte e extravasamento de plasma e de células sanguíneas para o tecido conectivo, culminando em hemorragia por rexe ou a jato (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000 *apud* JUNQUEIRA, 2005).

As metaloproteases são sintetizadas na glândula peçonhífera como proteínas compostas de multidomínios, inclusive um domínio pró-enzima e um domínio catalítico protease zinco-dependente em que ambos se conservam na molécula (GUTIERREZ, 2002 *apud* MAZZI, 2005 *apud* TORRES, 2007). Essas enzimas podem ser divididas em quatro classes (P-I a P-IV) dependendo da sua estrutura e massa molecular com diferentes atividades. Metaloproteases de classe P-I são pequenas com cerca de 24 kDa, têm apenas o domínio metaloprotease e não apresentam ação hemorrágica. A classe P-II apresenta proteínas de tamanho médio com cerca de 35 kDa, e contém o domínio desintegrina adicional no sítio C-terminal, podendo ser subdivididas em P-II, P-IIa e P-IIb, de acordo com sua ação proteolítica (JUNQUEIRA, 2005). A classe P-III com massa molecular de cerca de 55 kDa tem o domínio tipo desintegrina e outro rico em cisteína, sendo esta a mais potente na atividade hemorrágica, podendo ser subdividida em classe P-III, P-IIIa, P-IIIb. A classe P-IV são as maiores proteínas com cerca de 95 kDa, apresentam

do, apesar disso, pequena atividade hemorrágica. As metaloproteinases das peçonhas ofídicas (MPVS) têm sido demonstradas como ferramentas muito úteis para concepção de processos de adesão entre células e célula-matriz extracelular. Metaloproteinases contendo um domínio de desintegrina, ou desintegrinas isoladas, são potentes inibidores da agregação plaquetária, e efetivos agentes no tratamento clínico de trombose. Essas desintegrinas têm sido demonstradas como inibidores de crescimento de metástases (ARAÚJO, 2000). Metaloproteinases fibrinolíticas também têm se mostrado promissoras no tratamento de trombose.

A matriz extracelular (MEC) é uma mistura de macromoléculas como colágeno, proteoglicano, fibras elásticas e glicoproteínas não-colagênicas, que são autodeláveis e oferecem suporte mecânico para órgãos e tecidos. É a MEC que, dependendo do contexto, controla diferentes processos celulares como o crescimento, morte, migração, adesão, expressão gênica e diferenciação. Estes eventos participam dos processos fisiológicos como o embrionário, formação tecidual, angiogênese, transformação e metástases em processos tumorais (CORRÊA, 2005).

As proteases degradam, inicialmente, as proteínas extracelulares em contato direto com a célula que constituem a MEC; depois, avançam em direção ao tecido conjuntivo propriamente dito. Das quatro famílias de proteases presentes num ambiente de degradação tumoral, as metaloproteases da MEC são as que se apresentam mais abundantemente e de forma mais diversificada. São conhecidos alguns membros da família das metaloproteases que se apresentam absolutamente fora de controle da ação dos inibidores enzimáticos teciduais num ambiente tumoral (REISS, s/d).

1.3. Mitomicina C

A mitomicina C (MMC) foi isolada, por Wakaki e colaboradores, de culturas de *Streptomyces caespitosus* em 1958. Quatro mitomicinas são de origem natural. Todas são antibióticos efetivos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas somente a MMC e a porfiromicina apresentam atividade antitumoral. A MMC tem sido utilizada em quimioterapia no tratamento de vários tipos de tumores sólidos, mas seu uso é limitado em razão dos efeitos colaterais, tais como mielossupressão e danos gastrintestinais. Em razão disto, vários análogos da MMC têm sido sintetizados buscando diminuir a toxicidade e aumentar a eficácia (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

1.4 Teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* é um animal díptero do Reino Animalia; Filo Artrópode, Classe Insecta, Ordem Díptera, Família Drosophilidae, Gênero *Drosophila* e espécie *D. melanogaster*, e é a mais conhecida mosca da história da ciência. Chamada mosca-da-banana, este díptero tem sido intensivamente estudado há cerca de um século, e o seu genoma foi completamente sequenciado no ano 2000. Existem coleções significativas de mutantes para os mais diversos fenótipos, bem como de rearranjos cromossômicos úteis no mapeamento genético. A manutenção laboratorial em temperatura ambiente (18-25° C) e as poucas exigências nutricionais e de espaço de cultura, aliadas ao fato de a morfologia deste organismo ser facilmente observável com uma lupa que

amplie 20-40 vezes, tornam este inseto num modelo adequado ao ensino da Genética (GRIFFITHS *et al.*, 1999).

A *Drosophila melanogaster* é um organismo eucarionte que tem $2n = 8$ cromossomos, sendo 3 pares de autossomos e 1 par sexual. É um organismo amplamente utilizado pelos pesquisadores, pois é de fácil manutenção em laboratório, tem um ciclo reprodutivo curto, fornece um grande número de indivíduos por progênie e apresenta reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos, o que permite um certo grau de extrapolação para humanos (GRAF, 2006).

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos tem estimulado estudos na indução e no desenvolvimento de tumores nessas moscas, estudos estes que podem contribuir diretamente para o entendimento de cânceres em seres humanos. Em adição, numerosos proto-oncogenes e supressores de tumores de mamíferos são conhecidos em *Drosophila*. Esta conservação evolutiva dos genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos indica uma importante ferramenta na indução e desenvolvimento de tumores no disco imaginal das células da mosca, contribuindo na compreensão do desenvolvimento de cânceres em humanos (EEKEN *et al.*, 2002). Segundo Nishiyama *et al.* (1999), o gene *warts* (*wts*) foi identificado com base na sua habilidade para ação como um supressor de tumor em *Drosophila*. A deleção desse gene leva à formação de clones de células circulares e extremamente invasivas, chamadas de verrugas, que desenvolvem ao longo do corpo da mosca. Este disco imaginal da *Drosophila*, de acordo com Eeken *et al.* (2002), corresponde a um grupo de células da mosca em estágio larval que durante a metamorfose se desenvolvem nas estruturas da epiderme do indivíduo adulto. O ciclo de regulação celular do disco imaginal é muito similar às células somáticas de mamíferos.

As proteínas kinases e CDK (quinase dependente de ciclinas) formam um complexo responsável pelo controle da regulação do ciclo celular em *Drosophila* e participam desse controle diversos genes oncogenes e genes supressores de tumor. Um dos genes envolvidos no controle da regulação gênica do ciclo celular em *D. melanogaster* é o gene *wts* (*warts*); este gene tem homologia ao gene supressor de tumor *LATS1* em mamíferos (EEKEN *et al.*, 2002).

O gene *wts* (*warts*) codifica uma proteína denominada serina/treonina quinase importante na progressão do ciclo celular, especificamente na mitose (NISHIYAMA *et al.*, 1999). O marcador *wts* é uma mutação recessiva letal em homozigose nos zigotos. Devido à letalidade, o alelo *warts* é mantido na linhagem estoque com a presença de um balanceador cromossômico (TM3). Por meio do cruzamento entre linhagens *wts/TM3* com *multiple wing hairs* (*mwh/mhw*) são obtidas larvas heterozigotas (*wts/+*). Se ocorrer a perda da heterozigose nas células do disco imaginal, haverá formação de clones homozigotos, o que é viável em conjuntos de células isoladas da larva, que se manifestam como tumores na mosca adulta (SIDOROV *et al.*, 2001).

2. Materiais e métodos

2.1. Agente biológico – metaloprotease do veneno da serpente *Bothrops*

A metaloprotease cedida foi de classe P-I, sem qualquer domínio desintegrina ou rico em cisteína. Para o tratamento foram utilizados três diferentes concentrações das MPVS: 0,025 mg/mL; 0,0125 mg/mL e 0,00625 mg/mL isoladas e as mesmas concentrações em associação à Mitomicina C. A metaloproteases do veneno das serpentes (MPVS) foi obtida pela Universidade Federal de Uberlândia, isolada e gentilmente cedida pela Professora Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

2.2. Agente Químico – Mitomicina C (MMC)

A MMC é o agente químico com ação citotóxica utilizado neste trabalho como controle positivo. A MMC utilizada neste trabalho é fabricada por Kyowa HAKKO Kirin Co. Ltd. Shizuoka (Japão) e embalado por Bristol-Myers Squibb S.r.l.Sermoneta-Latina-Itália. Importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica S.A. Rua Carlos Gomes, 924, Santo Amaro – São Paulo-SP. A embalagem contém 5 mg/frasco-ampola.

2.3. Diluições

Foi diluído um frasco ampola contendo 5 mg de Mitomicina C em 10 ml de água. Junto a esse composto foi colocado 140 mL de água (osmose reversa) utilizada como solvente e 0,1 mM (concentração MMC), totalizando um volume de 150 mL. Para preparação de 0,025 mg de MPVS foram utilizadas 3,0 mg desta enzima, e homogeneizado com 120 ml de água osmose reversa. Para o preparo da concentração de 0,0125 mg foram utilizadas 30 ml de MPVS (0,025 mg) + 30 ml de água osmose reversa. Para a preparação de 0,00625 mg foram utilizadas 30 ml de MPVS 0,0125 mg/ml + 30 ml de água osmose reversa totalizando um composto com 60 mL.

2.4. Linhagens mutantes de *D. melanogaster*

As seguintes linhagens de *Drosophila melanogaster* foram utilizadas: 1) *wts/TM3, Sb1*, linhagem que apresenta um alelo letal *warts (wts)*, no cromossomo 3, balanceado por um cromossomo TM3, caracterizado por múltiplas inversões e marcado por uma mutação dominante *stubble (Sb)*, que é caracterizada, fenotipicamente, pela presença, em todo corpo da mosca, de pêlos curtos e mais grossos. Esta linhagem foi gentilmente cedida pelo Bloomington *Drosophila Stock Center*, da Universidade de Indiana, USA, com o número de registro: Bloomington/7052; 2) *multiple wing hairs (mwh/mwh)*. As moscas da linhagem *mwh* têm o gene marcador no cromossomo 3 (3-0,3) numa posição distal, caracterizado por expressar três ou mais pêlos em cada célula. A linhagem é mantida em homozigose por ser esta uma mutação viável. Esta linhagem foi gentilmente cedida pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of

Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Suíça).

2.4.1. Cruzamento

Foram feitos cruzamentos entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb* com machos *mwh/mwh* para obtenção de larvas heterozigotas *wts +/+ mwh*. Desse cruzamento, todas as larvas foram tratadas com os agentes químicos testes. No entanto, foram analisadas somente as moscas que não tiverem o balanceador cromossômico (*TM3, Sb*), por este não permitir a manifestação de tumor.

2.4.2. Tratamento

A Mitomicina C foi utilizada em pré-tratamento, realizado 6 horas antes do tratamento com a metaloprotease, com a intenção de induzir a formação de tumor epitelial em qualquer parte do corpo da mosca

Larvas de 72 horas de idade, provenientes deste cruzamento, foram coletadas por filtração com um funil de metal e uma malha fina, sob água corrente, e transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batatas (meio de cultura instantâneo, alternativo para *Drosophila*), aos quais foram adicionados 5 mL de solução-teste, com três diferentes concentrações da peçonha contendo MPVSS (0,025 mg/mL; 0,0125 mg/mL e 0,00625 mg/mL). Foi feito um pré-tratamento de 6 horas com MMC (0,1 mg/mL) e, posteriormente, foram adicionadas as mesmas concentrações de MPVSS para avaliação da atividade anticarcinogênica. Um controle negativo (água osmose reversa) e controle positivo (MMC – 0,1 mg/mL isolado) foram inclusos no tratamento. Em cada tratamento foram feitas cinco repetições. Neste esquema de tratamento as larvas ficaram expostas aos agentes químicos e biológicos testados por um período de aproximadamente 48 horas, até ocorrer a empupação.

2.4.3. Análise das moscas

Após metamorfose, os indivíduos adultos foram transferidos para recipientes contendo etanol 70% e analisados machos e fêmeas, com genótipo (*wts +/+ mwh*), que apresentam o fenótipo com os pêlos normais. As análises dos tumores foram feitas em microscópio estereoscópico da marca Coleman, com uma ampliação padrão de 25x. Foram considerados tumores quando grandes o suficiente para serem classificados de forma inequívoca.

2.5. Análise estatística

As diferenças estatísticas entre a frequência de tumor das concentrações testadas e os controles foram calculadas usando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney.

3. Resultados e discussão

Algumas proteínas sem ação enzimática como as desintegrinas presentes na peçonha botrópica têm ação antitumoral, o que já foi amplamente demonstrado em pesquisas utilizando mamíferos roedores. Algumas proteínas com ação enzimática como a enzima fosfolipase (PLA₂) apontam baixa ação antitumoral, e as metaloproteases são alvo de estudos, mas em mamíferos; ainda não tem sido demonstrada ação antitumoral (FERREIRA *et al.*, 2008).

Os tumores foram encontrados na cabeça, olhos, pernas, asas e halteres; basicamente em toda parte do corpo das moscas adultas. Nas moscas, nem todos os precursores de diferentes partes do corpo são bem conhecidos. Em partes específicas do corpo dos animais, tais como os olhos e as pernas, os precursores celulares estão localizados em áreas bem definidas, durante a fase de larva, e são conhecidos como as células do disco imaginal. As análises e a localização de cada tumor foram conduzidos de acordo com cada região do corpo da mosca.

Na figura 2 pode ser visualizado o tumor ocorrido na perna e, na figura 3, o tumor no corpo da mosca. Em cada tratamento foram analisadas 200 moscas. No tratamento controle positivo (MMC 0,1 mM), foram encontrados 748 tumores (3,74 tumores por mosca), distribuídos por todo o corpo da mosca. A maioria dos tumores foi observada no corpo (27,3 % do número total de tumores) e na asa (24,86 %). O restante foi distribuído pelo restante do corpo: pernas (19,4 %), cabeça (13,9 %), olhos (11,8 %) e halteres (2,8 %).



Figura 2: Tumor epitelial na perna da mosca.



Figura 3: Tumor epitelial no corpo da mosca.

Nos indivíduos tratados com água osmose reversa (controle negativo) a frequência foi de 11 tumores distribuídos, principalmente, pelo corpo (36,4 %), e pernas (27,3 %). Esta frequência espontânea de tumores, observados principalmente no corpo da mosca, também foi verificada por Sidorov *et al.* (2001). Segundo os autores estas

frequências de tumores são as mais altas, entre todos os órgãos, porque eles têm o maior número de células e maior período de proliferação celular.

Com base na tabela 1, os resultados demonstraram que os descendentes tratados apenas com diferentes concentrações de MPVS (0,00625 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,025 mg/mL); não apresentaram qualquer alteração, estatisticamente significativa, nas frequências de tumores, quando comparadas ao controle negativo ($P > 0,05$). Portanto, nas condições experimentais demonstrada em nosso estudo, nenhum efeito na indução de tumor foi verificado pela MPVS.

Por outro lado, avaliando o efeito da MPVS (0,00625 mg/mL, 0,0125 mg/mL, 0,025 mg/mL) após tratamento com MMC (0,1 mM), foi verificada uma pequena redução, porém estatisticamente significativa ($P < 0,05$), nas frequências de tumores, nas mais altas concentrações testadas (0,0125 mg/mL, 0,025 mg/mL). Na concentração de 0,025 mg/mL (MPVS) houve uma redução de 14% na frequência total de tumores induzidos pela MMC. Na concentração de 0,0125 mg/mL (MPVS) esta redução foi de 18% nos tumores, induzidos pela MMC.

Tabela 1. Frequência de clones de tumor observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, pré-tratada com mitomicina C (6 horas) e posteriormente tratada com diferentes concentrações de metaloprotease.

Tratamentos		Número de moscas analisadas	Número de tumores analisados							Frequência (Nº de tumores/mosca)
Metaloprotease (mg/mL)	MMC (mM)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total	
0	0	200	2	1	1	4	3	0	11	0,055
0	0,1	200	88	104	186	204	145	21	748	3,740*
0,025	0	200	0	1	6	4	1	0	11	0,055
0,0125	0	200	2	0	4	5	2	2	15	0,075
0,00625	0	200	1	2	3	0	0	4	6	0,030
0,025	0,1	200	86	75	163	143	162	17	644	3,220**
0,0125	0,1	200	93	23	160	138	153	42	611	3,055**
0,00625	0,1	200	143	40	163	170	174	45	734	3,670

Diagnóstico estatístico de acordo com Mann-Whitney Teste. Nível de significância $P = 0,05$

* Valor considerado diferente do controle negativo ($P < 0,05$).

** Valor considerado diferente do controle positivo (MMC 0,1 mM) ($P < 0,05$).

MMC, mitomicina C; mM milimolar.

A grande atividade proteolítica encontrada nas peçonhas botrópicas é o constituinte principal da maioria dos danos fisiopatológicos, observados durante o envenenamento pelas serpentes *Bothrops* (SILVA; BERNARDES; OLIVEIRA, 2008).

Silveira *et al.* (2004) relatam que as metaloproteases de venenos de serpentes (MPVS) são responsáveis por vários efeitos tóxicos e farmacológicos, causando hemorragias, proteólises, edemas, mionecroses, efeitos bactericidas, anti-tumorais e trombolíticos.

Silva (2000) relata que a ação citotóxica da peçonha ofídica é potencialmente perigosa, intervindo em processos como a transmissão neuromuscular e a hemostasia. O autor ainda diz que há trabalhos na clonagem e sequenciamento de DNAs que codificam toxinas de venenos viperídeos. Dentre elas, as metaloproteases constituem uma importante família de toxinas, responsáveis pela hemorragia local e sistêmica induzida pelos venenos viperídeos.

Jucá *et al.* (2008) relatam que metaloprotease de matriz (MMP-1 e MMP-7) estão envolvidas diretamente no crescimento tumoral e no processo metastático, especialmente em câncer colorretal. Foi evidenciado que intestinos de pacientes com doença inflamatória intestinal apresentam risco de desenvolver câncer colorretal, pois exibem níveis aumentados de MMP-1,3,7 e 14. Estudos demonstram que cultura de células endoteliais de veia umbilical secreta MMP-7, sugerindo a possibilidade de esta enzima estar envolvida na angiogênese do tumor.

A *Drosophila melanogaster* apresenta dois genes para MMP (MMP-1 e MMP-2). Segundo Page-McCaw *et al.* (2003), estas metaloproteases não participam durante o desenvolvimento embrionário, mas apenas no processo de remodelação de tecidos, após o terceiro estágio larval. Foi feita uma comparação entre as duas metaloprotease de matriz da *Drosophila*, MMP de outro invertebrado, e MMP de mamíferos. O resultado das três MMPs mostrou que existe estreita relação entre diferentes MMPs humanas, e as duas MMPs da mosca. Porém a metaloprotease utilizada neste experimento foi isolada da peçonha ofídica, não estabelecendo relação entre esta e a MMP da mosca, pois ela entrou em contato com a Metaloprotease da peçonha apenas após o terceiro instar larval.

Dos quatro tipos de metaloprotease que existem no veneno da serpente, aquela a qual poderia se atribuir alguma ação antitumoral é a tipo P-II, pois existe na sua estrutura um domínio desintegrina comprovadamente inibidor de crescimento do câncer e antimetastático, porém a metaloprotease utilizada na presente pesquisa foi a tipo P-I, de menor massa molecular (24 kDa) que não apresenta atividade hemorrágica. Ainda assim, por meio do nosso estudo, é possível atribuir uma ação redutora de tumores pela enzima metaloprotease (P-I) isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, nos tratamentos analisados em suas maiores concentrações (0,025 mg/mL e 0,0125 mg/mL) por meio do teste *wts* em *D. melanogaster*.

Os mecanismos pelos quais MPVS reduzem os tumores não foram avaliados diretamente, em nossos estudos.

4. Conclusão

As enzimas proteolíticas presentes na peçonha ofídica, em especial as proteases botrópicas, têm sido alvo de pesquisas para a produção de fármacos por possuir acentuado potencial terapêutico. No presente trabalho pode-se concluir que a metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* demonstrou atividade antitumoral apresentando redução no número de tumores no tecido epitelial da mosca *D. melanogaster* adulta, avaliada por meio do teste wts (*warts*). Novas investigações devem ser feitas para analisar a atividade antitumoral dessa enzima e outras proteínas da peçonha, para obtenção de resultados positivos tanto em *Drosophila* como em mamíferos.

Referências

- ARAÚJO, H.S.S. Expressão de metaloproteínas recombinantes de veneno de serpente com potencial de uso terapêutico. *Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde*, 2000.
- BACURAU, R. F. P.; COSTA ROSSA, L. F. B. P. Efeitos do exercício sobre a incidência e desenvolvimento do câncer. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, *Rev. Paul. Educ. Fís.*, São Paulo, 11(2):142-47, jul./dez. 1997.
- BAMSHAD, M. J. *et al.* *Genética Médica*. 3 ed. São Paulo: Elsevier, 2004.
- BLAGOSKLONNY, M.V. Carcinogenesis, therapy câncer and chemoprevention. *Nature Publishing Group. Cell, Death and Differentiation*. New York, v. 12, p. 592-602, 2005.
- BORGES, R. C. *Serpentes Peçonhentas Brasileiras: manual de identificação, prevenção e procedimentos em caso de acidentes*. São Paulo: Atheneu, 2001.
- BROWN, T. A. MOTTA, P.A.; BARBOSA, L.O. M. *Genética, um enfoque molecular*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- CALMETTE A., SAENZ A., COSTIL L. Effects du venin de cobra sur les greffes cancéreuses et sur le cancer spontane (adeno-carcinome) de la souris. *C. R. Acad. Sci.*, 197, 205.1933.
- CAMPBELL, J.A; LAMAR, W.W. *The venomous Reptiles of Latin America*. Itaca, London, 425p. 1989.
- CASTANHEIRA, L. E.; RODRIGUES, R. S.; CARDOSO, T. M.; OTAVIANO, A. R. BRANDEBURGO, M. I. H.; ÁVILA, V. M. R.; HAMAGUSHI, A. Isolamento e caracterização do gene que codifica a hialuronidase presente na peçonha de *Bothrops pauloensis*. *IX Encontro interno e XIII Seminário de Iniciação Científica*. Universidade Federal de Uberlândia. s/d.
- CHIPPAUX, J. P. Snakes-bites: appraisal of de global situation. *Bulletin of the World Health*

Organization, vol. 75, p. 515-524, 1998.

COMINETI, M. R. Estudos dos efeitos de Metaloproteases/desintegrinas isoladas do veneno de serpentes *Bothrops alternatus* sobre a adesão celular e expressão gênica. *Universidade Federal de São Carlos*. Tese para obtenção do título de Doutor, 2004.

CORRÊA, T. C. S. *Ação do gene supressor de tumor e de metástase RECK no processo de invasão tumoral: modelo de interação célula matrix-extracelular em gliomas humanos*. Universidade de São Paulo. Dissertação para obtenção do grau de Mestrado.

COSTA, L. C. G. P. *Efeito citotóxico e antitumoral da bothropstoxina-1 e da Crotamina*. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

EEKEN, J.C. J.; CLINK, I.; VEEN, B. L. V.; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor supressor gene wts. *Enviromental and Molecular Mutagenesis*, v. 40, p. 277-282, 2002.

FRANCO, L. F. Origem e diversidade das serpentes, in: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F.H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD, JR. V. *Animais peçonhentos do Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. FAPESP, São Paulo: Sarvier, p. 13-32, 2003.

FERREIRA, F. B., RODRIGUES, R. S., CARDOSO T., ÁVILA, V.M.R. Caracterização química, enzimática e citotóxica de uma Fosfolipase A₂ ácida isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*. *XII Seminário de Iniciação Científica*. Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

GRAF, U.; SINGER, D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient*, v. 8, p. 15-27, 1992.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C. GELBART, W.M. Trad. MOTTA, P. A. *Introdução à Genética*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

HIGUSHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTO, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHÃES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHES, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAÚJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and Partial characterization of two Phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* (White-Tailed-Jararaca) Snake Venom. *Bioquimie*. v. 89, p.319-328, 2007.

INCA-INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2010- Incidência do Câncer no Brasil, 2010.

JUCÁ, M.; NUNES, B. L.B.P.; MENEZES, H. L.; GOMES, E. G. A.; MATOS, D. Metaloproteinases 1 e 7 e câncer colorretal. *Rev. Bras. Coloproct*, p. 253-262, 2008

JUNQUEIRA, M. R. *Aplicação de técnicas proteômicas na caracterização do veneno das serpentes Bothrops insularis (Viperidae)*. Instituto Oswaldo Cruz. Dissertação para obtenção de Título de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro, 2005.

LOURO, I. D.; LLERENA JR. J. C. MELO, M. S. V.; ASHTON-PROLLA, P.; FRÓES, N. C. *Genética Molecular do Câncer*. 2 ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts supressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *Febs Letters*, 1999; 459: 159-165.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Química Nova*, v. 25, n. 6, São Paulo, nov./dez. 2002.

PAGE-McCAW, A.; SERANO, J.; SANTÉ, J. M.; RUBIN, G. M. *Drosophila* matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Developmental Cell*, v. 4, p. 95-106, jan., 2003.

REISS, M. L. V. *Revisão das Metaloproteases envolvidas em processos tumorais*. Centro Municipal de Saúde Américo Veloso. S/d.

SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E.G.; KHOVANOVA, E.M.; BELITSKY, G.A. Induction of tumor clones in *D. Melanogaster wts/+* heterozygotes with chemical carcinogens. *Mutation Research*, v. 498, p. 181-191, 2001.

SILVA, A. M. M. *Expressão dos domínios da jararhagin, uma metaloproteinase desintegrina do veneno de B. jararaca, e seu papel na resposta inflamatória*. Secretaria do Estado da Saúde-Instituto Butantã, out. 2000.

SILVA, C. M. BERNARDES, C. P. OLIVEIRA, F. *Fracionamento e ensaios proteolíticos da peçonha e frações da serpente Bothrops moojeni*. XII Seminário de Iniciação Científica, Universidade Federal de Uberlândia. 2008.

SILVA, T.H.A.; BUTERA, A.P.; LEAL, D.H.S.; ALVES, R.J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese- Modelos farmacofóricos para inibidores de integrina $\alpha v\beta 3$, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 1, jan/mar 2007.

SILVEIRA, L. B.; MARCUSSI, S.; FERNANDES, V. C.; MAZZI, M. V.; CAMBRAIA, R. S.; SANT'ANA, C. D.; MALTA-NETO, N. R.; FRANÇA, S. C.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Isolamento e Caracterização Bioquímica de uma Metaloprotease Não-hemorrágica do Veneno de *Bothrops jararacussu*. XII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Carlos – UFS-Car, 2004

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. *Fundamentos da Genética*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SUZUKI, D. et al. *Introdução a Genética*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 794 p. 2002.

TORRES, F. S. *Purificação e caracterização bioquímica parciais de uma fração fibrinogenolítica presentes na peçonha de serpentes Bothrops mojen (HOGE, 1965; Viperidae)*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

TOYAMA, D. O. *Estudo das frações proteicas derivadas do veneno de serpentes "Crotáicas e Botrópicas" com atividade antibacteriana. Isolamento, purificação e caracterização bioquímica e biológica*. Tese para obtenção de Título de Doutor, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

VALLE, A. L. BRITES, V. L. C. *Nomes populares e aspectos ecológicos de Bothrops pauloensis (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. Revista Brasileira de Zoociências*, v. 10, n. 2, 2008.

WHITE, J. *Snake venom and coagulopathy*, *Toxicon*, v. 45, p. 951-967, 2005.