

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DE  
UMA DESINTEGRINA-RGD RECOMBINANTE DE *BOTHROPS ALTERNATUS* E  
SEU EFEITO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (HUVEC)**

**Carmen Lucia Salla Pontes**

**SÃO CARLOS  
2006**

**OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DE  
UMA DESINTEGRINA-RGD RECOMBINANTE DE *BOTHRUPS ALTERNATUS* E  
SEU EFEITO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (HUVEC)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ADICIONAL DE  
UMA DESINTEGRINA-RGD RECOMBINANTE DE *BOTHRUPS ALTERNATUS* E  
SEU EFEITO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (HUVEC)**

**Carmen Lucia Salla Pontes**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Evolução da Universidade  
Federal de São Carlos, como parte  
dos requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Evolução.**

**Orientadora: Heloísa Sobreiro  
Selistre de Araújo.**

**SÃO CARLOS  
2006**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P814op

Pontes, Carmen Lucia Salla.

Otimização da purificação e caracterização adicional de uma desintegrina-RGD recombinante de *Bothrops alternatus* e seu efeito em células endoteliais humanas (HUVEC) / Carmen Lucia Salla Pontes. -- São Carlos : UFSCar, 2006. 121 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Bioquímica. 2. Desintegrina. 3. Anticorpos policlonais. 4. Proteínas recombinantes – purificação. I. Título.

CDD: 574.192 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**“OTIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
ADICIONAL DE UMA DESINTEGRINA-RGD RECOMBINANTE DE  
*Bothrops alternatus* E SEU EFEITO EM CÉLULAS  
ENDOTELIAIS HUMANAS (HUVEC)”**

Carmen Lucia Salla Pontes

Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Submetida a defesa pública no dia 23 / 11 /2006,

tendo sido: APROVADA

Presidente: Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

Membros: Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Homologado na 194ª Reunião Ordinária da CPG,  
em 04/12/2006.

Presidente: .....

Membros: .....

SÃO CARLOS - SP  
2006

Dedico este trabalho aos meus pais, Carmela e Paulo (*in memoriam*)  
a minha avó Olga (*in memoriam*) e ao meu irmão,  
Francisco Arthur, pela paciência e compreensão pela minha  
ausência em alguns momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Carmela e Paulo (*in memorian*) pelo total respeito, e compreensão na escolha de ser Bióloga e de seguir o caminho da pesquisa científica.

Agradeço à minha avó, Olga (*in memorian*) pelo amor dedicado a mim e ao meu irmão desde crianças, para que meus pais pudessem trabalhar e proporcionar um futuro para mim e meu irmão.

Agradeço ao meu irmão Francisco Arthur, que apesar das nossas diferenças de opiniões, sempre quis o meu melhor.

Agradeço às minhas amigas, Ana Emília e Nenis, que como eu tiveram que sair do conforto da casa dos pais para seguir o caminho que cada uma sonhou e entendem o sumiço às vezes de meses sem notícias.

Agradeço à minha amiga Ellen, que sempre disse que o que eu fazia era uma loucura e que ela não iria nunca trabalhar nessa área, imaginem só, o doutorado dela é em que área?? Clonagem e Expressão de proteína!! pela amizade, compreensão e ajudas de última de hora que mesmo a distância que agora temos não deixou separadas.

Agradeço às minhas amigas que conquistei durante a graduação e que permaneceram como eu aqui em São Carlos, Diana, Andréia e Viviane pela força e incentivo.

Agradeço o carinho, a compreensão e o apoio das minhas sempre amigas Aninha, Let's (Gabi), Sky (Karla, minha irmãzinha), Quet's (Mônica), Momy's (Monique), Vivi (Viviane), companheiras de "baladas", de alegrias e tristezas e que agora não

dividimos mais a mesma casa, nem a mesma cidade, mas sempre vamos dividir nossos sonhos, nossas vitórias uma com as outras.

Agradeço à minha amiga “quase futura médica” Marisa que eu conheci quando ela começou a fazer biologia na UFSCar em 2001 mas que resolveu seguir atrás do seu sonho e daqui a pouco já terá realizado. Obrigada pela amizade e compreensão.

Agradeço à minha sempre amiga Bruna, que neste ano não apenas dividi as minhas preocupações como também a mesma casa. Espero que nossa amizade que se iniciou no nosso primeiro dia em São Carlos continue por muitos anos.

Agradeço à Cíntia, uma amiga recente, que sempre me incentiva e a Raquel, que sempre que dá vem visitar São Carlos e que veio para a minha qualificação.

Agradeço aos amigos, Oscar, Cristina, Carol, Renner, Ademar e Ana Flávia que passaram pelo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e que me ensinaram muito.

Agradeço aos amigos que ainda estão comigo trabalhando no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Beth, Jú, Márcia, Raquel, Mônica, Rita, Milena, Thaíssa, Verzola, Cláudio, Zé Roberto, Carol Martins, Silvia, Aline, Rafael, Juliana, por toda a compreensão, ajuda, incentivo, força nos momentos mais estressantes e mais felizes.

Agradeço à Regiane, secretária do programa do PPG-GEV pela paciência e diversas ajudas nos assuntos burocráticos.

Agradeço a colaboração do prof. José César Rosa, do Centro e Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos Agra, da FMRP-USP nas análises de espectrometria de massa.

Agradeço a respectividade e orientação da prof. Dra. Verônica Morandi e suas alunas, Camila e Marianna, dos Laboratórios do Departamento de Biologia Celular e



Genética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) durante as semanas que passei sob sua orientação nos ensaios realizados com células endoteliais.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço em especial a minha orientadora, prof. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, pela orientação, paciência e confiança em mim depositada. Obrigada pela oportunidade de realizar um bom trabalho.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram no caminho construído durante esse mestrado.

Obrigada!

"O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos". Lao-Tsé

## RESUMO

Desintegrinas são proteínas de veneno de serpentes, de baixo peso molecular, ricas em cisteína e em geral um peptídeo contendo o motivo RGD que liga especificamente a integrinas  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ,  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ , e  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  de plaquetas, células endoteliais e células tumorais. Os efeitos biológicos desses peptídeos estão relacionados com processos biológicos de adesão celular onde receptores denominados integrinas estão presentes. Esta dissertação descreve a otimização da purificação de uma desintegrina-RGD recombinante de *Bothrops alternatus*, *DisBa-01*, e a caracterização adicional desta proteína. A *DisBa-01* é uma desintegrina-RGD recombinante que interage com a integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  inibindo agregação plaquetária e proliferação de células endoteliais e algumas células tumorais. Neste trabalho, um novo protocolo de purificação foi proposto para a purificação mais eficiente da *DisBa-01*. A desintegrina, *DisBa-01*, foi expressa em um sistema bacteriano otimizado (*Escherichia coli* BL21(DE3)pET28a+*DisBa-01*) e purificada em coluna de afinidade. Neste novo protocolo, o produto da purificação na coluna de níquel é submetido à cromatografia de troca-iônica. O uso da cromatografia de troca-iônica aumentou o grau de pureza e o produto protéico final. A proteína purificada teve o N-terminal sequenciado em 20 resíduos de aminoácidos. A massa molecular foi determinada por espectrometria de massa que confirmou como 11.658 Da a massa da proteína. A desintegrina-RGD pura teve a cauda de polihistidinas eficientemente removida com proteólise com trombina. Anticorpos policlonais contra *DisBa-01* foram produzidos em camundongos. A reatividade desses anticorpos foi observada através de *immunoblotting*. Estes resultados estabelecem uma nova forma de obtenção da proteína pura, assim como informações adicionais significativas de uma melhor caracterização da desintegrina-RGD recombinante, *DisBa-01*, que pode ser útil para o estudo de desintegrinas-RGD, recombinantes ou nativas, e interações com integrinas.

**Palavras-chave:** Desintegrina-RGD recombinante, *Bothrops alternatus*, sequenciamento N-terminal, espectrometria de massa, purificação.

## ABSTRACT

Disintegrins are snake venom protein, of low molecular weight, rich in cysteines and RGD-containing peptides that bind specifically to integrins  $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, and  $\alpha$ v $\beta$ 3 expressed on platelets, endothelial and tumor cells. The biological effects of these peptides are related with biological process of cellular adhesion where receptors called integrins are presents. This dissertation describes the optimization of purification and additional characterization of a recombinant RGD-disintegrin of *Bothrops alternatus*, *DisBa-01*. The *DisBa-01* is a recombinant RGD-disintegrin, which interacts with  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin, inhibiting platelet aggregation and proliferation of endothelial and some tumor cells. In this work, a new protocol of purification was proposed for most efficient purification of the *DisBa-01*. The recombinant disintegrin, *DisBa-01*, was expressed in an optimized bacterial system (*Escherichia coli* BL21(DE3) pET28a+*DisBa-01*) and purified by affinity chromatography. In this new protocol, the product of the purification in nickel column is submitted ion exchange chromatography. The use of the ion exchange chromatography as second step for purification increased the purity degree and the protein yield. The purified protein had its N-Terminal portion sequenced in 20 amino acids residues and its molecular mass determined by mass spectrometry. The mass spectrometry assay confirmed the mass of the *DisBa-01* as 11.658 Da. The RGD-disintegrin pure had the tag of polihistidinas removed with thrombin. The cleavage of the tag of histidinas with thrombin was efficient. Polyclonal antibodies against *DisBa-01* have also been produced in mice. The reactivity of these antibodies was observed through imunoblotting. These results provided one better form of obtain the pure protein as well as significant additional information for a better characterization of recombinant RGD-disintegrin, *DisBa-01*, which could be useful for the study of RGD-disintegrin, recombinant or native, and integrin.

**Keywords:** RGD-disintegrin recombinant, *Bothrops alternatus*, N-terminal sequence, mass spectrometry, purification.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Distinção entre serpentes peçonhentas e não peçonhentas. ....	4
<b>Figura 2</b> Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero de serpente peçonhenta. ....	5
<b>Figura 3</b> <i>Bothrops alternatus</i> (urutu).....	6
<b>Figura 4</b> Família de Zinco Metalopeptidases. ....	15
<b>Figura 5</b> Representação esquemática de comparação das estruturas entre ADAMs e SVMPs classe P-III. ....	20
<b>Figura 6</b> Efeitos das SVMPs. ....	22
<b>Figura 7.</b> Diagramas esquemático das classes de metalopeptidases de veneno de serpentes (SVMPs). ....	24
<b>Figura 8.</b> Diagramas de família de integrinas e diferentes motivos tripeptídeos de interações integrina-ligante.....	47
<b>Figura 9</b> Estrutura das subunidades de uma Integrina.....	48
<b>Figura 10</b> Sequência traduzida da região de clonagem do vetor pET28DisBa. ....	63
<b>Figura 11</b> Mapa parcial do vetor pET-28 a com seqüência reconhecida pela Trombina . ....	76
<b>Figura 12</b> Análise de Expressão da DisBa-01 em <i>E.coli</i> (BI21(DE3)) por (SDS-PAGE 15%) .....	84
<b>Figura 13</b> Ensaio de Solubilidade da DisBa-01 (SDS-PAGE 15%). ....	85
<b>Figura 14</b> SDS-PAGE das amostras da cromatografia de afinidade. ....	86
<b>Figura 15</b> Perfil cromatográfico da Purificação da DisBa-01 em coluna de Troca-Iônica (Mono Q). ....	88
<b>Figura 16:</b> Análise das amostras eluídas da cromatografia de Troca-Iônica.....	89
<b>Figura 17</b> Dot-Blot Anti-Histag. ....	90
<b>Figura 18</b> Ensaio de Expressão e Solubilidade. Análise de frações em SDS-PAGE 15%.....	91
<b>Figura 19.</b> Sequenciamento de aminoácidos da DisBa-01. ....	92
<b>Figura 20</b> Alinhamento das Sequências da DisBa-01. ....	92
<b>Figura 21</b> Ensaio de Clivagem com Trombina. Análise em SDS-PAGE 15%. ....	93
<b>Figura 22</b> Espectrometria de Massa. ....	94
<b>Figura 23</b> Titulação anticorpos anti-DisBa-01 em camundongos por dot blot. ....	96
<b>Figura 24</b> Efeito da DisBa-01 na adesão de células endoteliais (HUVEC). ....	97
<b>Figura 25</b> Efeito da DisBa-01 na proliferação de células endoteliais (HUVEC) com a toxina imobilizada nos poços. ....	98
<b>Figura 26</b> Efeito da DisBa-01 na proliferação de células endoteliais (HUVEC). ....	99

**Lista de Tabelas**

Tabela 1 Integrinas e seus ligantes na MEC.....	47
Tabela 2 Purificação de DisBa-01 recombinante em 1 Litro de cultura de células de E.coli BL21(DE3)pDisBa-01.....	90

## Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Descrição
ACLD-C:	Tipo-desintegrina com domínio rico em cisteína da serpente <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>
ADAM	Proteína modular com domínios metalopeptidases e tipo-desintegrina
ADAMT	ADAM com domínio adicional que contém repetições do tipo 1, encontrado nas trombospondinas
Alt-C	Alternagina-C
CAM	Molécula de adesão celular
BAG	Metaloprotease-desintegrina dimérica de <i>Bothrops alternatus</i>
BCA	Ácido Bicincrônico
BCIP	Bromo cloro indoil fosfato
bFGF	“Basic fibroblast growth factor”
BSA	Soro albumina bovina
cDNA	DNA complementar
DisBa-01	Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxidoribonucléico
D.O	Densidade óptica
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Fator de crescimento de epiderme
FAK	“Focal adhesion kinase”, quinase de adesão focal
GST	Glutathione S-transferase
GP	Glicoproteína
HMEC	Células endotélias humanas de microvasculatura de derme
HUVEC	Células endotélias de veia de cordão umbilical humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D- tiogalactopiranosídeo
MAPK	“Mitogen-activated protein kinase”
MBP	“Maltose binding protein”
MEC	Matriz extracelular

<b>mRNA</b>	<b>RNA mensageiro</b>
<b>MMPs</b>	<b>Metaloproteases de matriz extracelular (Matrix Metalloproteases)</b>
<b>Mt-MMPs</b>	<b>MMP ancoradas a membrana plasmática</b>
<b>MP</b>	<b>Metaloprotease</b>
<b>MTT</b>	<b>“3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue”</b>
<b>MWCO</b>	<b>“Molecular weight cut off”</b>
<b>nm</b>	<b>Nanômetros (10<sup>-9</sup>m)</b>
<b>NBT</b>	<b>Cloreto de “nitroblue” tetrazólio</b>
<b>NMR</b>	<b>Ressonância nuclear magnética</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PBS</b>	<b>Salina tamponada por fosfato</b>
<b>PCR</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase</b>
<b>pDisBa-01</b>	<b>Plasmídeo recombinante obtido pela ligação do pET 28 a com o produto da amplificação dos oligonucleotídeos F1 e R1.</b>
<b>PI 3-K</b>	<b>“Phosphoinositide 3-OH kinase”</b>
<b>PVDF</b>	<b>“PolyVinylidene DiFluoride”</b>
<b>RGD</b>	<b>Seqüência argina-glicina-ácido aspártico.</b>
<b>SFB</b>	<b>Soro fetal bovino</b>
<b>rpm</b>	<b>Rotações por minutos</b>
<b>S1</b>	<b>Sobrenadante de extrato celular obtido em condições não desnaturantes</b>
<b>S2</b>	<b>Sobrenadante de extrato celular obtido em condições desnaturantes</b>
<b>SDS</b>	<b>Duodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio</b>
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS</b>
<b>SVMPs</b>	<b>Metaloproteases de veneno de serpente</b>
<b>SVTLEs</b>	<b>Enzima trombina-símile de veneno de serpente</b>
<b>TBS</b>	<b>Solução tamponada com NaCl e Tris</b>
<b>T0</b>	<b>Tempo zero de indução do extrato bacteriano</b>
<b>T3</b>	<b>Tempo de 3 horas após a indução do extrato bacteriano</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Fator de necrose tumoral <math>\alpha</math></b>
<b>TRX</b>	<b>Tioredoxina</b>



<b>VEGF</b>	<b>Fator de crescimento vascular e endotelial</b>
<b>BCIP</b>	<b>5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato de p-toluidina</b>
<b>D/ECD</b>	<b>Seqüência adesiva formada por ácido aspártico/ ácido glutâmico-cisteína-ácido aspartico</b>
<b>ELISA</b>	<b>Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)</b>
<b>SVTLEs</b>	<b>Enzimas trombina-símile de veneno de serpentes</b>
<b>FA</b>	<b>Adesão focal</b>
<b>FAK</b>	<b>Quinase de adesão focal</b>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	<b>Fosfolipases de veneno de serpentes A<sub>2</sub></b>
<b>GP</b>	<b>Glicoproteína</b>
<b>IL</b>	<b>Interleucina</b>
<b>LB</b>	<b>Meio de cultura de bactérias (Luria Bertani)</b>
<b>MAPK</b>	<b>Proteína quinase ativadora de mitose</b>
<b>MDC</b>	<b>Metaloproteinase-desintegrina-rico em cisteína</b>
<b>MEC</b>	<b>Matriz extracelular</b>
<b>MMP</b>	<b>Matrix MetalloPeptidases</b>
<b>MT-MMP</b>	<b>Transmembrana- matriz metaloproteinase</b>
<b>MP</b>	<b>Metaloproteinase</b>
<b>NBT</b>	<b>Cloreto de nitroblue tetrazoilo</b>
<b>PDECGF</b>	<b>Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor</b>
<b>PI</b>	<b>Ponto isolelétrico</b>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	<b>fosfolipase de veneno de serpente A<sub>2</sub></b>
<b>PVDF</b>	<b>Polifluoreto de vinilideno</b>
<b>TEV</b>	<b>“Tobacco etch vírus”</b>
<b>TIMPs</b>	<b>Inibidor tecidual de metaloproteinases</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Fator de necrose tumoral alfa</b>
<b>VCAM</b>	<b>Molécula de adesão celular vascular</b>
<b>VEGF</b>	<b>Vascular endothelial growth factor</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Composição de Venenos .....	7
1.2 Metalopeptidases.....	13
1.3 MMP (Metalopeptidases de Matriz) .....	16
1.4 ADAMs .....	19
1.5 SVMP .....	21
1.6 Desintegrinas .....	29
1.6.1 Desintegrinas Não-RGD (Desintegrinas-like) e seus efeitos .....	37
1.6.2 Os papéis das Desintegrinas RGD .....	41
1.7 Integrinas .....	44
1.8 Interação Integrinas-Doenças-Desintegrinas .....	53
1.9 DISBA-01 .....	59
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	<b>61</b>
<b>3.MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
<b>3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS</b> .....	<b>62</b>
3.1.1 Proteína .....	62
3.1.2 Resinas Cromatográficas.....	63
3.1.3 Animais.....	64
3.1.4 Western Blotting (Imunodeteção) .....	64
3.1.6 Padrões Moleculares de Proteína .....	65
3.1.7 Diálise .....	65
3.1.8 Concentração da amostra .....	65
3.1.9 Quantificação Protéica .....	66
3.1.10 Clivagem com Trombina .....	66
3.1.11 Sequenciamento de proteína .....	66
3.1.12 Determinação de massa molecular por eletrospray – espectrometria de massas.....	67
3.1.13 Linhagem Celular.....	67
3.1.14 Cultivo Celular.....	68
3.1.15 Outros Reagentes .....	68
<b>3.2 MÉTODOS</b> .....	<b>68</b>
3.2.1 Ensaio de Expressão e Solubilidade .....	68
3.2.2 <i>Eletroforese em SDS-PAGE</i> .....	70
3.2.3 <i>Purificação da DisBa-01</i> .....	71
3.2.4 Cromatografia de Afinidade.....	71
3.2.5 Diálise .....	72
3.2.6 Cromatografia de Troca Iônica .....	73
3.2.7 Ensaio de Imunodeteção (Western Blotting/Dot Blot).....	73
3.2.8 Dosagem de Proteínas .....	74
3.2.9 Clivagem com Trombina .....	75
3.2.10 Sequenciamento de Aminoácidos .....	76
3.2.11 Espectrometria de Massa .....	77
3.2.12 Imunização dos Camundongos .....	77
3.2.13 Titulação dos Anticorpos Policlonais.....	78
3.2.14 Documentação de Imagens .....	79
3.2.15 Ensaio Celulares .....	80
3.2.16 Ensaio de adesão .....	80
1 Promoção de adesão.....	80

2. Adesão celular para controle da proliferação .....	81
3.1 Ensaios de proliferação proteína imobilizada .....	81
3.2 Ensaios de proliferação proteína solúvel.....	82
<b>4.1 Ensaio de Expressão e Solubilidade .....</b>	<b>84</b>
<b>4.2 Purificação da Proteína Recombinante .....</b>	<b>86</b>
4.2.1 Cromatografia de Afinidade.....	86
4.2.2 Cromatografia de Troca-Iônica.....	87
<b>4.3 Seqüenciamento da Proteína Recombinante .....</b>	<b>91</b>
<b>4.4 Ensaio de Clivagem com Trombina .....</b>	<b>92</b>
<b>4.5 Espectrometria de Massa .....</b>	<b>93</b>
<b>4.6 Obtenção dos Anticorpos Policlonais Anti-DisBa-01.....</b>	<b>95</b>
<b>4.7 Ensaios Celulares .....</b>	<b>96</b>
4.7.1 Ensaio de Adesão Celular .....	97
4.7.2 Ensaio de Proliferação .....	98
4.7.2.1 Proteína Imobilizada nos poços .....	98
4.7.2.2 Proteína Solúvel nos poços .....	99
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>108</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>109</b>
<b>8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>110</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade a serpente é um animal que desperta a curiosidade e o imaginário da humanidade. Em cada região do planeta a serpente assume um simbolismo diferente. A começar pela antiga escritura, na qual a serpente, conhecida como representação do Mal, incita a curiosidade de Eva sobre o fruto da Árvore do Bem e do Mal no Jardim do Éden (Gênesis). Já no Médio Oriente e região do Mar Egeu, a serpente representa um antigo deus da sabedoria. As serpentes são figuras recorrentes, constantemente envolvidas em mitos, ora incorporando o papel da sabedoria de diversas maneiras ora o mal e a morte. A serpente também pode ser referida como símbolo universal da renovação e regeneração que conduz a imortalidade, tudo em virtude de sua capacidade de trocar de pele (muda).

Na civilização ocidental atual a serpente é comumente encontrada nos símbolos das Ciências Contábeis como referência a Mercúrio, que na Antiguidade Clássica ficou conhecido com o protetor dessa arte e que carregava consigo um cedro envolvido por duas serpentes (caduceu). Esta figura de serpente também é encontrada nos símbolos da Medicina, da Química, da Farmácia, mas como sendo uma única serpente que envolve o cedro de Esculápio (Deus da Cura).

A palavra serpente vem do latim *serpens, serpentis* (que rasteja ou rastejante).

As serpentes são animais vertebrados, representantes da classe dos répteis com o maior sucesso de radiação existente, tanto em termos de número de espécie quanto de distribuição geográfica (CADLE, 1987; KEOGH, 1998).

Sabe-se que as serpentes surgiram no período Cretáceo Inferior, há cerca de 135-130 milhões de anos atrás, quando os grandes dinossauros estavam em fase de extinção. Gradualmente surgiram as primeiras serpentes como répteis bem distintos. Hipóteses clássicas sugerem que os *Sauria*, grupo de lagartos, deram origem as serpentes, sendo as mais primitivas com vestígios de membros posteriores (BUTANTÃ, 2006). A discussão dessa hipótese voltou ao cenário científico com a publicação de uma nova espécie, a *Najash rionegrina*, datada de 90 milhões de anos (Cretáceo Superior) com vestígios de membros posteriores, reascendendo a discussão da origem das serpentes, mar ou terra, sendo essa agora, a hipótese mais aceita na comunidade científica (APESTEGUÍA, 2006).

A *Najash rionegrina* foi descrita a partir de um fóssil encontrado em bom estado de conservação e quase completo na província de Rio Negro, na Argentina em 2002. Esta serpente apresenta duas vértebras sacrais responsáveis pela fixação e sustentação das patas posteriores, com cerca de 20 milímetros. A análise da região posterior do crânio revelou uma mandíbula curta incapaz de ingerir grandes presas (BICUDO, 2006).

Infelizmente, inferências de relações filogenéticas tanto dentro quanto entre as linhagens de serpentes são frequentemente difíceis porque elas são estruturalmente homogêneas. Muitas das adaptações morfológicas de serpentes são resultados de redução ou simplificação de estruturas encontradas em seus ancestrais saurianos (KEOGH, 1998).

Independente da questão da data de surgimento das serpentes na face da Terra ou das inferências filogenéticas, as serpentes são membros da classe dos répteis, portanto animais de corpo coberto por escamas que lhes confere aspecto ora brilhante ora opaco e às vezes até áspero, não controlam a temperatura corporal (ectotérmicos) sendo esta muito parecida com a temperatura do ambiente.

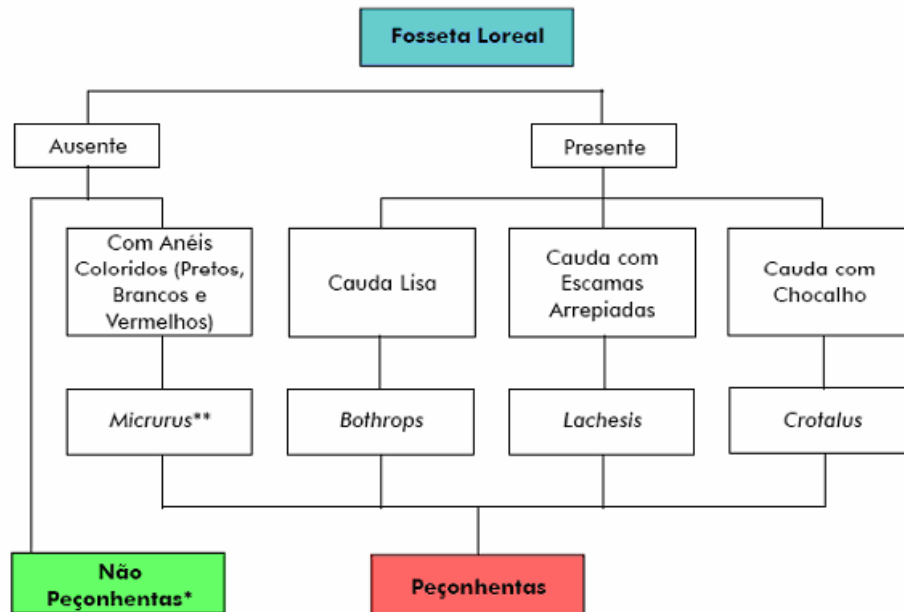
As serpentes apresentam corpo alongado, sem membros e revestido por escamas epidérmicas córneas, importantes na sua identificação e classificação. A camada

superficial deste revestimento é trocada durante as mudas que ocorrem em intervalos variáveis. Todos os órgãos internos são tubulares e acompanham a geometria do corpo. A coluna vertebral é alongada e há uma complexa ligação entre músculos, vértebras, costelas e pele, o que torna possível os movimentos das serpentes.

Um dos sentidos mais apurados das serpentes, usado para explorar o ambiente, localizar presas e predadores além de parceiros para o acasalamento é o olfato. Isto se deve à língua bifurcada, estreita, flexível capaz de captar moléculas no ambiente e analisá-las no vômero nasal (cavidades no palato) também chamado de órgão de Jacobson (IBAMA, 2006).

As serpentes podem ser classificadas em dois grupos básicos: as peçonhentas, isto é, as que possuem aparato inoculador de peçonha e as que não o possuem. Esses dois grupos podem ser encontrados no Brasil, em diferentes habitats, inclusive em ambientes urbanos.

Há alguns critérios básicos para a distinção de serpentes peçonhentas de não peçonhentas (figura 1). Um deles é a presença da fosseta loreal, uma membrana rica em terminações nervosas, ligadas ao cérebro. Toda serpente peçonhenta apresenta esse sensor térmico localizado entre a narina e os olhos e permite à serpente perceber variações mínimas de temperatura na ordem de  $0,003^{\circ}\text{C}$  (IBAMA 2006, BUTANTÃ, 2006). Outra característica importante na distinção de serpentes peçonhentas das não peçonhentas é o tipo de cauda. As serpentes com fosseta loreal que apresentarem cauda com um tipo de chocalho ou uma cauda lisa até a extremidade ou ainda uma cauda com extremidade escamas eriçadas, essas podem ser chamadas de serpentes peçonhentas.



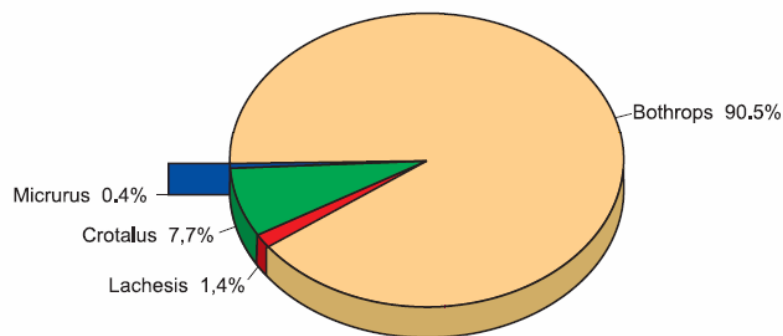
**Figura 1.** Distinção entre serpentes peçonhentas e não peçonhentas.  
Extraído de FUNASA, 200

Um outro aspecto que distingue as serpentes não peçonhentas das peçonhentas é o tipo de dentição. As dentições presentes nas não peçonhentas são de dois tipos: áglifa, pequenos dentes fixos e maciços, e a opistóglifa, também pequenos dentes fixos e maciços além de um par de dentes mais longos com sulcos por onde a saliva pode escorrer. São serpentes não peçonhentas, portanto a jibóia, a sucuri entre outras. Já as dentições das serpentes peçonhentas são de dois tipos distintos. A dentição proteróglifa, um par de dentes dianteiro que injeta o veneno, fixo, pequeno e semi - caniculado e pouco se destaca dos outros dentes pequenos e a dentição solenóglifa na quais os dentes fixos são menores destacando os que injetam o veneno, que são longos, dianteiros, caniculados capazes de movimentar para frente para desferir o bote (BUTANTÃ, 2006).

Dentre os acidentes por animais peçonhentos, o acidente ofídico é o principal deles, pela sua frequência e gravidade. Ocorre em todas as regiões e estados brasileiros e é um importante problema de saúde quando não se institui a soroterapia de forma precoce e

adequada. A distribuição dos acidentes ofídicos no país indica incidências elevadas na região Centro-Oeste e Norte, apesar do número absoluto de casos ser maior no sudeste. Da mesma forma, a ocorrência dos acidentes ao longo do ano apresenta marcada sazonalidade, com predomínio dos casos nos meses quentes e chuvosos e aumento da atividade humana nos trabalhos no campo (FUNASA, 2001).

As serpentes peçonhentas existentes no Brasil pertencem ao gênero *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* que são responsáveis por mais de 20.000 acidentes notificados anualmente ao Ministério da Saúde (RIBEIRO, 1997). Os acidentes botrópicos representaram, no período de 1990-1993, 90,5% dos acidentes ofídicos no país enquanto os acidentes crotálicos representaram 7,7 % (figura 2). No entanto, o maior índice de letalidade com acidentes ofídicos é referente aos acidentes com o gênero *Crotalus* (FUNASA, 2001).



**Figura 2** Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero de serpente peçonhenta. Extraído do **Manual de Acidentes Animais Peçonhentos, FUNASA, 2001**.

De aproximadamente 2000 espécies diferentes de serpentes, cerca de 300 são peçonhentas. Serpentes peçonhentas são encontradas nas famílias Colubridae, Hydrophidae, Elapidae, Crotalidae e Viperidae (KARALLIEDDE, 1995).

No Brasil, a família Viperidae tem como representante o gênero *Bothrops*. Compreende cerca de 30 espécies de serpentes, distribuídas por todo o território nacional.



Elas habitam ambientes úmidos, áreas cultivadas e regiões com facilidade para proliferação de roedores. São popularmente conhecidas como urutu-cruzeiro (figura 3), jararaca, jararacuçu. O gênero *Crotalus* também é um representante da família Viperidae. Agrupa várias subespécies, encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e não tem hábito de ataque. Sua característica principal é o guizo ou chocalho na cauda. A maior serpente peçonhenta das Américas, a surucucu, também faz parte da família Viperidae. A surucucu pertence ao gênero *Lachesis*, que habita florestas e matas úmidas.

As corais, gênero *Micrurus*, fazem parte da família Elapidae e são animais de pequeno e médio porte e apresentam anéis vermelhos, brancos e pretos em qualquer tipo de combinação. Por fim, no Brasil ainda há a família Colubridae com representantes peçonhentos. São espécies do gênero *Clélia* e *Philodryas* (FUNASA, 2001).



**Figura 3** *Bothrops alternatus* (urutu). Acesso 21/09/2006.  
<http://www.venomousreptiles.org/libraries/showfilepage/152?offset=36>

Através da história, envenenamento por toxina animal tem fascinado os humanos. Raramente um fenômeno médico teve tanta associação religiosa, simbolismo, contos engraçados e provocou tão grande interesse profissional. As toxinas animais tiveram uma significativa contribuição para elevar o conhecimento na fisiologia humana e farmacologia. Informações sobre a natureza e o mecanismo de ação dessas toxinas têm

permitido maior pesquisa científica no tratamento de suas intoxicações (KARALLIEDDE, 1995). A mordida de serpentes é sempre uma ameaça presente em muitas comunidades tanto de nações desenvolvidas como subdesenvolvidas. Embora antivenenos tenham por um longo tempo reduzido a mortalidade, a sua produção permanece baixa. Por essa razão, o entendimento dos componentes do veneno, resultado de estudos bioquímicos, farmacológicos e moleculares é de extrema importância para a otimização de agentes terapêuticos (CHENG, 2002).

Neste cenário, o Brasil, com sua grande biodiversidade, graves problemas de saúde pública, dificuldades de acesso a medicamentos e potencial de pesquisas médicas, está incentivando estudos com substâncias extraídas de nossa biodiversidade. Esses estudos estão na pauta de investimentos do Ministério de Ciência e Tecnologia, que irá financiar até 2008 projetos de pesquisa para a produção de medicamentos a partir de matérias-primas encontradas na fauna e flora brasileira (bioprodutos) (BRASIL, 2004).

Juntamente com antivenenos, pesquisas com venenos de serpentes têm grande potencial para a descoberta de novas drogas terapêuticas, refletindo talvez um redescobrimto da sabedoria das antigas culturas. Muitas proteínas dos venenos de serpentes possuem certamente muitas propriedades terapêuticas poderosas incluindo indução da fibrinólise e inibição da agregação plaquetária, entre outras (CHEN, 2002).

### ***1.1 Composição de Venenos***

As toxinas normalmente encontradas em veneno animal estão ainda associadas a um aparato de envenenamento especializado que permite sua distribuição em tecidos de

animais por via subcutânea, intramuscular ou intravenosa. O veneno de serpente é secretado e armazenado em glândulas de venenos e usado primeiramente para o ataque, imobilização e contêm componentes projetados para imobilizar a presa e facilitar a sua digestão (KARALLIEDDE, 1995, MENEZES, 2006).

Os efeitos exercidos pelos venenos de serpentes são complexos porque seus diferentes componentes têm ações distintas e, podem também agir sinergisticamente com outras toxinas do veneno o que potencializa suas atividades. A maioria dos venenos compreende uma mistura altamente complexa de peptídeos, freqüentemente com diversidade e seletividade farmacológica. Esta biodiversidade faz com que os peptídeos de venenos sejam uma fonte única a partir da qual seja possível propor e moldar estruturalmente novos agentes terapêuticos (LEWIS, 2003).

Os venenos de serpentes são normalmente compostos de uma mistura complexa de componentes orgânicos e inorgânicos. Restos insolúveis de tecidos são também freqüentemente encontrados em venenos de serpentes exploratórias. Os constituintes inorgânicos nos venenos incluem:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{P}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , e  $\text{Zn}^{2+}$  (FRIEDERICH, 1971; BJARNASON, 1994). Nem todos esses metais são encontrados em todo tipo de veneno e a quantidade de cada metal varia com a espécie de serpente. O papel biológico de cada um dos metais não é claro, entretanto, parece que alguns deles, como o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , são absolutamente importantes na estabilização de certas proteínas do veneno, enquanto outros, em particular o  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , podem ser participantes reais do mecanismo catalítico de certos componentes enzimáticos do veneno, como as metaloproteinases. É conveniente dividir os componentes orgânicos do veneno de serpentes em material protéico e material não protéico. A maioria dos venenos brutos é composta de componentes protéicos e peptídeos que exibem uma variedade de atividade biológica (BJARNASON, 1994). Mais de 95 % do peso seco da maioria dos venenos são polipeptídeos

que incluem enzimas, toxinas e pequenos peptídeos, cada classe sendo capaz de modular a resposta fisiológica no animal envenenado (KARALLIEDDE, 1995). Os outros componentes incluem carboidratos (glicoproteínas), lipídios (principalmente fosfolipídios), amins biogênicas (particularmente abundante em venenos Viperidae e Crotalidae), nucleotídeos e aminoácidos (BJARNASON, 1994, SOUZA, 2000).

A variabilidade do veneno tem sido investigada e também documentada. Isto ocorre em diversos níveis incluindo variações em interfamílias, intergêneros, interespecies e intraespecies (CHIPPAUX, 1991; MENEZES, 2006). Além disso, a composição do veneno pode ser influenciada pela origem geográfica e habitat da serpente. Variação intraespecífica do veneno pode ocorrer entre indivíduos de uma mesma espécie devido à variação sazonal, dieta, habitat, localidade geográfica, idade e dimorfismo sexual (CHIPPAUX, 1991, FRANCISCHETTI, 1998; MENEZES, 2006).

A heterogeneidade desses venenos pode explicar as diferenças nos sintomas clínicos observados após envenenamentos (FRANCISCHETTI, 1998) e essa variação protéica nos venenos pode ser importante para estudos de aspectos evolucionários de serpentes peçonhentas. Estudos com serpentes capturadas prenas indicam que a variação intraespecífica no veneno é geneticamente herdada assim como induzida ambientalmente (DALTRY, 1996; MENEZES, 2006).

Há muitos efeitos potenciais em humanos seguidos ao envenenamento pelas serpentes, mas apenas umas poucas categorias são de maior significância clínica (WHITE, 2005). Dentre elas estão a paralisia flácida, miólise sistêmica, coagulopatia e hemorragia, falência e perigo renal, cardiotoxicidade, injúria local tecidual no sítio da mordida. Cada uma dessas pode causar inúmero efeitos secundários e cada um com um potencial de morbidade e mortalidade.

Qualquer espécie de serpente pode mostrar atividade em uma ou mais categoria dessas, entretanto raramente em todas. No passado assumia-se que uma única espécie de serpente causaria efeitos locais ou sistêmicos e que serpentes Viperidae causavam efeitos locais e/ou hemorragia, enquanto Elapidae causavam apenas efeitos sistêmicos, não-hemorragicos. Esta hipótese estava inteiramente incorreta. Deve-se, no entanto lembrar que humanos não são presas naturais para nenhuma serpente peçonhenta e que o efeito de algum componente do veneno na presa pode ser diferente do que o efeito em humanos (WHITE, 2005).

Os venenos afetam elementos chaves de vias fisiológicas de quase todos os animais (LU, 2005). Interferência com aspectos do sistema hemostático de humanos é tema comum dentro de venenos de serpentes. A diversa exibição de componentes de veneno afetando a hemostase é espelhada apenas em parte da diversidade de efeitos clínicos (WHITE, 2005). O veneno induz uma complexa série de efeitos locais como hemorragia, mionecrose e edema além de efeitos sistêmicos como hemorragia sistêmica, desordem de coagulação, choque cardiovascular e falência renal aguda (GAY, 2005). Esses efeitos são induzidos por uma variedade de componentes do veneno.

As toxinas de veneno de serpente que afetam a hemostase podem ser classificadas em virtude de seu efeito geral: coagulante (enzimas trombina-símile e toxinas ativadoras de protrombina), anticoagulante (toxinas ativadoras de Proteína C), fosfolipases A<sub>2</sub>, ativadoras de plaquetas e anti-plaquetária, fibrinolítica e hemorraginas (metalopeptidases) (GAY, 2005; MARSH, 2005).

Perto de 100 toxinas de veneno de serpentes têm sido descritas como enzimas trombina-símile. Esta proteína está amplamente distribuída em vários gêneros de serpentes viperídicas assim como em colubridas (LU, 2005). Esta serino protease de cadeia única tem um sítio ativo reconhecido nas posições dos resíduos H57-D102-S195 embora existam

algumas diferenças em regiões flanqueadoras se comparado com outras serino proteases. Por outro lado, embora algumas ações destas enzimas trombina-símile de veneno de serpentes (SVTLEs) lembrem os efeitos da trombina, o grupo não apresenta todas as propriedades comuns da trombina, isto é, clivagem tanto do fibrinopeptídeo A e B do fibrinogênio e ativação do fator XIII. Por causa das SVTLEs não ativarem o fator XIII, os coágulos produzidos *in vitro* são friáveis e facilmente quebrados. A perda dos coágulos em vivo conduz a uma destruição rápida pelo sistema fibrinolítico e eficiente remoção do fibrinogênio do plasma. As SVTLEs mais amplamente usadas são a enzima do veneno de *Bothrops atrox* (Batroxobin) e a de *Callosellasma rhodostoma* (Ancrod) (MARSH, 2005).

Um grande número de venenos de serpentes contêm ativadores de protrombina que convertem protrombina em trombina e meizotrombina. Baseado em suas estruturas, características funcionais e co-fatores requeridos, eles são classificados em quatro grupos. Ativadores do grupo A, são metaloproteinases e ativadores de protrombina sem cofatores. Eles são distribuídos extensivamente em venenos viperídeos. O grupo B é cálcio-dependente. Eles têm duas subunidades ligadas não covalentemente: uma metaloproteinase e um tipo lectina tipo C ligados como dímero por pontes dissulfeto. Já o grupo C são serinoproteases que necessitam de cálcio e fosfolípidios para a ativação. Estas enzimas são exclusivamente encontradas em elapídeos australianos. O grupo D de ativadores de protrombina também são serinoproteases, fortemente dependente de cálcio e vesículas de fosfolípidios carregados negativamente, mas também fator Va da cascata de coagulação plasmática. Algumas enzimas ativadoras de protrombina são estrutural e funcionalmente homólogas a fatores de coagulação (LU, 2005, MARSH, 2005).

O fator V é uma glicoproteína multifuncional de 330 kDa, com importante papel na procoagulação e anticoagulação. A trombina ativa o fator V pela clivagem nos

resíduos 709, 1018 e 1545 resultando na forma fator Va, um heterodímero que age como cofator na ativação da protrombina catalisada pelo fator Xa e aumenta a geração de trombina.

Ativadores de fator X são tanto serinoproteases como metalopeptidases e são encontrados em venenos Viperidae e Crotalidae, além de estar presente em alguns elapídicos.

A proteína C é uma proteína dependente de vitamina-K, um anticoagulante que quando ativado, degrada FVa e FVIIIa e participa do controle da hemostase. A maioria dos ativadores de proteína C de veneno tem seqüências altamente similares a outras serinoproteases de venenos.

As fosfolipases de veneno de serpentes A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) constituem um grupo diverso de proteínas que afetam a hemostase. Elas podem ser divididas em dois grupos, PLA<sub>2</sub> Asp 49 com alta capacidade catalítica e PLA<sub>2</sub> Lys 49 com muito baixa ou nenhuma atividade catalítica. O resíduo Asp 49, como parte do sitio de ligação ao cálcio, é crítico para atividade catalítica. As PLA<sub>2</sub> apresentam uma ampla variedade de efeitos farmacológicos entre eles a atividade anticoagulante devido a sua competição com fatores de coagulação pela ligação aos fosfolipídeos e não necessariamente a sua hidrólise.

As metalopeptidases também estão presentes no veneno de serpentes da família Crotalidae e Viperidae e agem sinergisticamente para degradar a matriz extracelular (MEC) de vasos sanguíneos e assim afetam a hemostase (LU, 2005, MARSH, 2005). Hemorragia local e sistêmica são manifestações comuns de vítimas atacadas por membros da família Viperidae (GUTIÉRREZ, 2006). Hemorragias são principalmente causadas por metaloproteinases, enzimas que são responsáveis por degradação de proteínas de matriz extracelular. Elas também têm efeito citotóxico em células endoteliais e agem nos componentes do sistema hemostático (ROODT, 2003).

## 1.2. Metalopeptidases

Membros da superfamília das Zinco metalopeptidases estão envolvidas em processos diversos, fisiológicos ou patológicos, que vão desde o desenvolvimento embrionário e formação de osso, até reprodução, artrite e câncer. Comparando as seqüências ao redor do motivo HEXXH, as Zinco metalopeptidases (Zincinas) foram classificadas em cinco distintas famílias: termolisina, astacina, serratia, matrixina e reprotisina. Essas famílias de zinco-metalopeptidases fazem parte da superfamília Metzincinas por possuem além do motivo de ligação ao zinco, HEXXH, uma metionina numa conformação similar denominada *Met-turn*. Além dessas superfamílias, há ainda as Inverzincinas, as Carboxipeptidases e as DD-Carboxipeptidases. Todas elas contem o sitio de ligação ao Zinco e um resíduo de histidina como o terceiro ligante ao metal.

As Inverzincinas é um grupo pequeno de metalopeptidases caracterizado pela inversão do motivo de ligação ao zinco (HXXEH). Membros desta família são encontrados em humanos, ratos, abelhas, bactérias e leveduras.

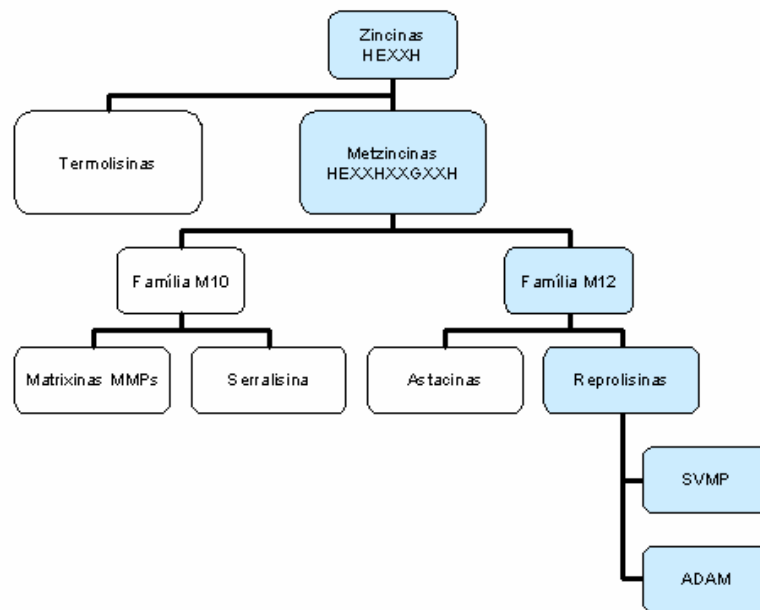
A família das Carboxipeptidases tem um único motivo de ligação ao zinco, sendo os dois primeiros ligantes histidina e o ácido glutâmico e a histidina, o terceiro ligante, localizado a uma certa distância a C-terminal do motivo. Esta família pode ser subdividida em três grupos distintos baseado na seqüência ao redor do sitio de ligação ao zinco.

Nas DD-Carboxipeptidases os três ligantes ao zinco são histidinas, duas que ocorrem em uma pequena seqüência *DHxHV*. Ao contrário ao que acontece com as outras zinco-metalopeptidases, a terceira histidina, ligante de zinco, está localizada a 42 resíduos no lado N-terminal do motivo, na seqüência *SRHMY*.



As Zincinas são todas zinco-metalopeptidases que contém a pequena seqüência consenso de ligação ao zinco. Um grande número de zincinas contém o terceiro ligante ao zinco como sendo o ácido glutâmico sendo denominados de Gluzincinas. Deste grupo faz parte a família das termolisinas e outras endopeptidases. As Termolisinas e várias metalopeptidases bacterianas apresentam duas regiões bem conservadas envolvidas na ligação ao zinco. A pequena seqüência de ligação ao zinco encontra-se dentro de uma longa seqüência consenso *HEXXHXBT*, enquanto o ácido glutâmico, o terceiro ligante de zinco, está à 25 resíduos no C-terminal, na seqüência consenso *GXBNEXBSD*.

Ao contrário das Gluzincinas, as metzincinas têm uma seqüência consenso longa de ligação ao zinco, *HEBXHXBGBXH* que contém três ligantes de zinco. Membros desta superfamília têm adicionalmente uma conformação *Met-turn*. Famílias distintas são identificadas dentro dessa superfamília: i) resíduos posteriores a terceira histidina de ligação ao zinco, ii) resíduos ao redor da metionina na conformação *Met-turn* (figura 4).



**Figura 4** Família de Zinco Metalopeptidases.  
Extraído e modificado de DECLERCK, 2000.

A família da astacina, uma metzincina, consiste de várias proteínas de diversas origens incluindo metalopeptidases de mamíferos. Uma das características que distinguem a família das astacinas é o resíduo de ácido glutâmico estar logo após a histidina, o terceiro ligante ao zinco.

Outra família pertencente à superfamília das metzincinas é a família das Serratia que contem diversas proteases extracelulares bacterianas de patógenos de plantas. Nesta família, a terceira histidina ligante de zinco é seguida por um resíduo conservado de prolina. E também, nas astacinas, há o potencial da tirosina ligar ao zinco na região consenso SBMSY da região *Met-turn*.

As colagenases, gelatinases, estromelinas de mamíferos são membros da família de metzincinas chamada Matrixina (*Matrix MetalloPeptidases*). Nesta família, a

seqüência consenso de três histidinas de ligação ao zinco é seguida por um resíduo de serina conservado (HOOPER, 1994).

### ***1.3 MMP (Metalopeptidases de Matriz)***

Uma família de potentes enzimas tem sido caracterizada e pode destruir todas as proteínas da matriz extracelular. Essas enzimas, chamadas MMPs, são formadas de domínios comuns e tem um número de propriedades também comuns. Metalopeptidases de matriz (MMP) compreende uma família de enzimas que degradam a matriz extracelular e que possuem um papel essencial no desenvolvimento e crescimento assim como o remodelamento e reparo.

As MMPs são expressas em baixos níveis nos tecidos normais, entretanto excessiva ou inapropriada expressão de MMP pode contribuir para a patogênese de muitos processos de destruição tecidual, incluindo doenças altamente predominantes como artrite, esclerose múltipla assim como permitir o desenvolvimento de doenças cardíacas e progressão tumoral (BIRKEDAL-HANSEN,1995, SHAPIRO, 1998, CHANG, 2001). A expressão de MMPs é fortemente controlada por fatores de crescimento e citocinas que induzem ou também suprimem a expressão de MMP (BIRKEDAL-HANSEN,1995, CHANG, 2001). Elas contêm seqüências comuns de aminoácidos, formando domínios distintos. As MMPs são secretadas na forma de proenzimas inativas. A sua ativação pode ser realizada proteoliticamente e é também acompanhada pela perda de massa molecular. Além disso, no sítio ativo há um íon de zinco. Por sua vez, as enzimas ativas clivam componentes da matriz

extracelular. Para a sua atividade, as MMPs requerem a presença do íon cálcio e são reguladas pela presença de inibidores teciduais de metalopeptidases (TIMPs) (CAWSTON, 1996).

As MMPs consistem em uma família de no mínimo 20 endopeptidases, maioria delas de origem de mamíferos, classificadas em quatro subgrupos baseado em seus domínios estruturais. Ao lado do zinco, necessário para o domínio catalítico, estas proteases têm um zinco adicional e um ou dois íons cálcio necessários para a estabilidade (DECLERCK, 2000).

Os quatro principais grupos de MMPs diferem em tamanho e pela especificidade do substrato que elas digerem. Elas são denominadas: estromelina, colagenase, gelatinase e MMP tipo membrana (CAWSTON, 1996, GÓMEZ, 1997). A mais simples protease desta família é a MMP-7 que consiste em três domínios, um peptídeo sinal, o pro-peptídeo e o domínio catalítico contendo o motivo de ligação ao zinco. O pro-peptídeo tem um resíduo de cisteína único localizado no motivo conservado PRCGVDP. Este resíduo de cisteína atua como quarto ligante ao zinco e previne a ativação pela molécula de água. A eliminação desse pro-peptídeo é necessária, entretanto, para a enzima torna-se ativa. Este mecanismo de ativação é denominado de *cisteína – switch*. O segundo subgrupo de MMPs é caracterizado pela presença de um domínio adicional C-terminal homólogo a hemopexina. Este domínio tem uma única ligação Cys-Cys e está ligada ao domínio catalítico por uma região rica em prolina. Esta participa no reconhecimento do substrato, interação com inibidores e ligação da enzima a matriz extracelular ou a superfície celular (DECLERCK, 2000). Deste grupo faz parte as colagenases intersticiais denominadas MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18 entre outras MMPs que não são colagenases como estromelina-2, estromelina-3 e uma metalopeptidase de macrófago. O terceiro subgrupo consiste de duas colagenases, MMP-2 e MMP-9. A principal característica dessas duas metaloproteínas é a presença dentro do domínio catalítico, de três repetições da sequência que é responsável pela ligação à gelatina. O quarto subgrupo de MMPs é caracterizado pela presença de 24 resíduos

de aminoácido hidrofóbicos inseridos entre o final do domínio hemopexina-símile e a cauda citoplasmática. Este domínio hidrofóbico é responsável pela localização dessas metaloproteinases na membrana plasmática.

A maioria das MMPs é secretada em forma solúvel em um ambiente extracelular, onde elas tornam-se ativadas. Entretanto, diversas MMPs podem preferencialmente localizar na superfície celular, ou pela presença do domínio transmembrana como no caso das MT-MMPs ou via interação com um tipo ligante-receptor. O substrato alvo para as MMPs são primeiramente proteínas insolúveis da MEC. Entretanto, as MMPs podem degradar outras proteínas além de proteínas da MEC (DECLERCK, 2000).

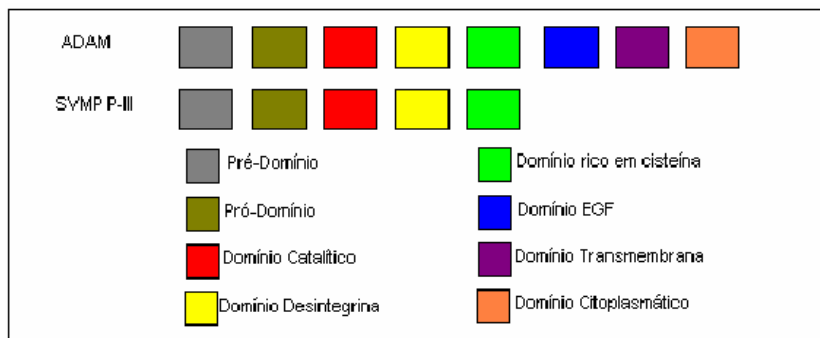
A homeostase da MEC durante o processo fisiológico, como desenvolvimento embrionário e ovulação, depende do balanço coordenado entre a deposição e remoção dos componentes do tecido conectivo. Mudanças no balanço entre proteases e seus inibidores podem alterar a composição da MEC e afetar as funções incluindo adesão, migração e diferenciação (GÓMEZ, 1997). A maioria dos processos requerem delicado balanço entre as funções de MMPs e seus inibidores (TIMPs) (CHANG, 2001). O controle das MMPs é realizado em diversos pontos: na estimulação da sua síntese, a nível gênico, através das citocinas; na síntese e secreção; na ativação das pró-enzimas e na inibição das enzimas ativas (CAWSTON, 1996).

As reprotolisinas incluem diversas proteases de veneno de serpentes (SVMP, *Snake Venom MetalloPeptidases*), incluindo as toxinas hemorrágicas e um grande número de proteínas reprodutivas de mamíferos (ADAM, *A Disintegrin And Metalopeptidase*) que possuem um resíduo de Asp após o terceiro ligante de zinco (HOOPER, 1994).

### *1.4 ADAMs*

As ADAMs têm implicações em diversos processos, incluindo ligação e fusão ovo-espermatozoide, fusão de mioblastos, processamento de ectodomínio de proteínas de citocinas, receptores de citocinas, proteínas de adesão e outros domínios extracelulares de proteínas e sinalização intracelular. Além disso, elas são necessárias para o desenvolvimento neural de *Drosophila*, maturação epitelial no desenvolvimento de camundongos. Percepção das funções têm surgido de estudos de apenas poucos membros da família, especialmente proteínas de espermatozóides, de enzimas conversoras de TNF- $\alpha$ . Para a maioria dos outros membros desta família, a função ainda não está relacionada.

Essas metalopeptidase-desintegrinas são uma família de glicoproteínas transmembranas que participam de interação célula-célula, célula-matriz e de processamento de ectodomínios de proteínas como TNF- $\alpha$  e delta. Elas são caracterizadas por um domínio estrutural conservado, consistindo em uma seqüência N-terminal conservada seguido por um pró-domínio, domínio metaloprotease e desintegrina, uma região rica em cisteína, similar as SVMP classe P-III, mas adicionalmente contém repetições de EGF-símile, e finalmente um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática (figura 5). O pró-domínio mantém o domínio metaloprotease em estado latente pela formação da coordenação zinco-cisteínas, cisteína-switch.



**Figura 5** Representação esquemática de comparação das estruturas entre ADAMs e SVMPs classe P-III.

De forma interessante, embora todas as ADAMs tenham um domínio metaloprotease bem conservado, apenas 15 têm a sequência consenso catalítica de ligação ao zinco (HEXXH), uma marca da superfamília Metzincina de zinco peptidases. Entretanto, apenas metade das ADAMs conhecidas são preditas como cataliticamente ativas, enquanto que as outras parecem perder a atividade metalopeptidases.

O modelo para a função das ADAMs nas interações célula-célula e liberação de ectodomínio tem que contar com o fato de que essas proteínas são ancoradas na membrana, e a existência de ADAMs que deixam a membrana sugere diversas outras possibilidades para essa família de proteína. Seu domínio desintegrina pode funcionar de maneira análoga a desintegrinas solúveis de veneno de serpentes, mediando a desadesão pela ligação a integrina. Alternativamente, a presença de novos domínios como trombospondina (ADAMTS) podem ser alvo de substrato ou ancoragem para essas proteínas na matriz extracelular. Neste contexto, o domínio desintegrina pode agir como ligante de integrinas ou proteína de superfície celular (SCHLÖNDORFF, 1999, SCHWETTMANN, 2001).

No ponto de vista de mecanismo, as funções das ADAMs na adesão célula-célula tem sido atribuída à atividade do domínio desintegrina como um ligante de integrina, apesar de que estas envolvem processamento de ectodomínio de proteínas que é atribuído ao domínio metalopeptidases (SCHLÖNDORFF, 1999, SCHWETTMANN, 2001).

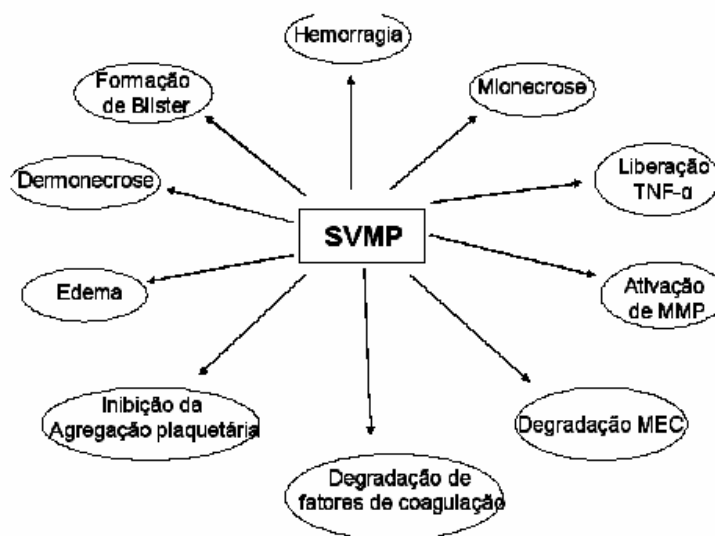
Entretanto, os domínios estruturais destas proteínas não são similares em seqüência com outras moléculas de adesão ancoradas em membranas ou proteases. Elas são relacionadas com domínios encontrados em famílias de proteínas solúveis de veneno de serpentes, as SVMPs (WOLFSBERG, 1995).

### ***1.5 SVMP***

O envenenamento por serpentes da família Viperidae é caracterizado por proeminentes efeitos locais incluindo necrose, hemorragia local, dor e edema que se desenvolvem rapidamente após o acidente e freqüentemente resultam em seqüela permanente. Concomitantemente, alterações sistêmicas como hemorragia, coagulopatia, e falência renal aguda pode ocorrer (figura 6) (TEIXEIRA, 2005).

A ação de toxinas de veneno de serpentes implica na ligação a uma variedade de alvos fisiológicos crítico interferindo com importantes processos como transmissão neuronal e hemostase. Um grupo particularmente importante de toxinas de veneno são as SVMPs, responsáveis pela freqüente e intensa hemorragia devido a ruptura dos vasos sanguíneos assim como pela inibição da agregação plaquetária (Fig. 6) (MOURA-DA-SILVA, 2003).





**Figura 6** Efeitos das SVMPs.  
Extraído e modificado de Gutiérrez 2005.

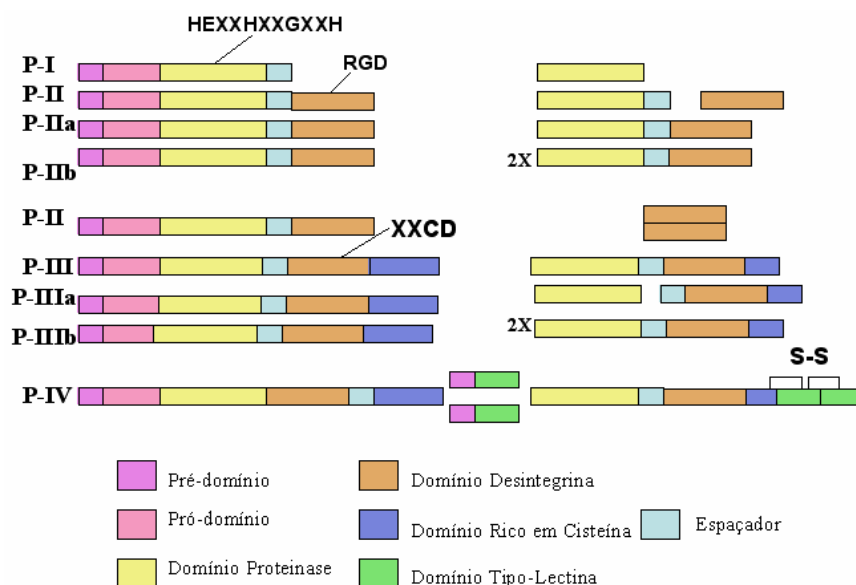
SVMPs podem ser hemorrágicas ou não hemorrágicas (KISHIMOTO, 2002, MARUYAMA, 2002), são fibrino(geno)lítica, assim como as serinoproteases, clivando preferencialmente a cadeia  $A\alpha$  mas também a cadeia  $B\beta$  do fibrinogênio (MATSUI, 2000). SVMPs estão presentes em altas concentrações em venenos viperídicos e mais recentemente tem sido descritas, ainda que em menor proporção, também em venenos elapídicos. Elas são encontradas em diferentes estados de processamento do zimogênio precursor (TANJONI, 2003). Estas metaloproteinases de veneno de serpentes (SVMP) são sintetizadas como zimogênios (KISHIMOTO, 2002, MARUYAMA, 2002) (preproenzimas) inativos, com um grupo tiol conservado bloqueando o sítio ativo pela ligação ao íon zinco. Após a secreção da glândula, o processamento proteolítico converte o zimogênio à enzima ativa pela remoção do grupo tiol, um módulo regulatório adicional, deslocando-o do sítio ativo permitindo assim o acesso do substrato. (MATSUI, 2000, HO, 2002).

As SVMPs são classificadas em quatro classes baseadas no tamanho do precursor cDNA/mRNA (N-classe ou classe baseada em nucleotídeo) ou no tamanho da proteína madura como ela é isolada no veneno (P-classe ou classe baseada na proteína) (FOX, 2005, RAMOS, 2006). A diferença em tamanho de precursores são reflexos do número de domínios protéicos codificados por cada classe de cDNA. O nucleotídeo classe I (N-I) tem a estrutura simples, e codifica um peptídeo sinal, um pro-domínio e um domínio metaloproteinase. Os clones de N-I dão origem aos produtos da classe I de proteína (P-I) tendo apenas um domínio metaloproteinase. A classe N-II codifica um domínio adicional, o domínio desintegrina (ou em casos raros domínio tipo-desintegrina), a carboxi do domínio metaloproteinase. Embora clones N-II dêem origem a produtos da classe P-II consistindo em domínio metaloproteinase e domínio desintegrina, a maioria deles são rapidamente hidrolisados a produto final, um peptídeo desintegrina. A classe N-III codifica, além do peptídeo sinal e dos domínios pró-, e catalítico, um domínio tipo-desintegrina, no lugar do domínio desintegrina, e também um domínio rico em cisteína a carboxi terminal. Outra classe, N-IV, tem a maior estrutura e dá origem a produtos da classe P-IV com um domínio adicional lectina a carboxi dos multidomínios da classe P-III (KISHIMOTO, 2002; MARUYAMA, 2002, BJARNASON, 1994).

Estudos têm demonstrado que domínios tipo-desintegrina /rico em cisteína de classe P-III de SVMPs podem ser liberados autoproteoliticamente em condições apropriadas. Isto sugere que alguns produtos da classe P-III podem estar processados no veneno, como a maioria dos casos de produtos da classe P-II (BJARNASON, 1994, KISHIMOTO, 2002, MARUYAMA, 2002).

Todos os grupos apresentam sinal, pro domínio e domínio proteinase homólogos. A classe P-I tem três domínios estruturais. A classe P-II tem um domínio adicional à carboxi do domínio proteinase: domínio desintegrina ou tipo-desintegrina. A

classe P-III têm ambos os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína à carboxi do domínio proteinase. Outra classe, a P-IV, tem sido descrita como tendo uma estrutura de domínios similar a classe P-III, mas com adicional domínio lectina. (BJARNASON, 1994, MOURA-DA-SILVA, 2003, RAMOS, 2006). As enzimas são ativadas pelo mecanismo de *cisteína-swicth*, também observadas em metaloproteinases, que degradam a matriz (MMP) (MOURA-DA-SILVA, 2003). A classe final de proteínas P-IV, possui a mesma estrutura da classe P-III com um domínio lectina adicional ligados por pontes dissulfeto.



**Figura 7.** Diagramas esquemático das classes de metalopeptidases de veneno de serpentes (SVMPS).

Extraído e modificado de BJARNASON E FOX, 1994 e FOX e SERRANO, 2005.

O peptídeo sinal é composto de dezoito aminoácidos, sendo que a maioria é constituída por resíduos hidrofóbicos que funcionalmente agem como um marcador de secreção. O pró-domínio modula a atividade enzimática através de interações com o domínio catalítico. Este é composto de 200 resíduos de aminoácidos e é altamente conservado nos

membros das SVMPs (RAMOS, 2006). Essa seqüência é rapidamente processada juntamente com o peptídeo sinal na proteína nascente ainda na glândula de veneno (BJARNASON, 1994, JIA, 1996).

O domínio catalítico ou metaloprotease (MP) é composto por 215 resíduos de aminoácidos, e é menos conservado que o pró-domínio. Este fato sugere que estas enzimas estão envolvidas na duplicação gênica de um ancestral comum e que o domínio catalítico tem passado por um processo evolucionário acelerado (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2003; RAMOS, 2006). As SVMPs tem entre duas a três pontes de dissulfeto no domínio proteinase. Entretanto, domínios proteinases com três pontes dissulfeto são encontrados nas estruturas das classes P-II, P-III e P-IV onde há adicionais domínios a carboxi do domínio proteinase (BJARNASON, 1994, JIA, 1996).

O peptídeo espaçador foi primeiro definido como um segmento interdomínio com 13-15 resíduos de comprimento, entre os domínios metaloprotease e desintegrina. No entanto, esse segmento pode ser liberado de alguns precursores, mas também podem ser encontrado em desintegrinas longas com domínio tipo-desintegrina. Nesses casos, uma cisteína extra está envolvida na formação de pontes de dissulfeto com o domínio a C-terminal, e, em alguns casos está relacionada com a resistência ao processamento proteolítico.

Os domínios desintegrina e tipo-desintegrina podem variar em comprimento de 41 a 100 resíduos e conteúdo de pontes de dissulfeto. Este domínio tem sido mostrado como um forte ligante de integrina. A sua ligação pode disparar interessantes efeitos biológicos mediado por integrinas que sugere diversas aplicações. A maioria das desintegrinas são liberadas de precursores SVMP PII e tem o motivo RGD que é relevante para ligação às subunidades de integrinas  $\beta_3$  e  $\beta_1$ . Também é conhecido que nenhum motivo RGD é encontrado em domínios tipo-desintegrina de SVMP PIII. No seu lugar, seqüências alternativas como DCD ou ECD são encontradas e por isso esse domínio ser denominado

tipo-desintegrina. Elas são distintas das desintegrinas encontradas no veneno de serpentes crotalídes e viperídes por apresentarem no mínimo um resíduo adicional de cisteína na estrutura. Elas são normalmente encontradas, no contexto de multidomínios, como uma estrutura única, não processada (BJARNASON, 1994, JIA, 1996, RAMOS, 2006).

As seqüências de desintegrinas exibem alta densidade de cisteínas. A maioria das desintegrinas conhecidas parece ser compatível com a hipótese que suas formas livres são liberadas de grandes precursores contendo o domínio metaloproteinase. Entretanto, algumas evidências têm recentemente surgido da análise de cDNA sugerindo uma origem alternativa e, também recentes descobertas sugerem que alguns domínios desintegrinas não são liberados de seu precursor metaloproteinase devido a uma ponte dissulfeto adicional que inclui uma cisteína da região espaçadora e o domínio desintegrina. Esta característica também é encontrada em ADAMs (RAMOS, 2006).

O domínio rico em cisteína, como o domínio desintegrina, tem alta densidade de cisteínas. Com cerca de 112 resíduos, está localizado a C-terminal do domínio desintegrina nas SVMP PIII (BJARNASON, 1994, JIA, 1996, RAMOS, 2006).

As SVMPs agem principalmente como fator hemorrágico, também chamada de hemorraginas, que exercem seus efeitos na degradação de proteínas como laminina, fibronectina, proteoglicanas, colágeno tipo IV da membrana basal endotelial. Proteínas da coagulação sanguíneas também são alvos de sua atividade proteolítica, ativando o estado hemorrágico. Junto a isso, as SVMPs podem também inibir a agregação plaquetária e disparar a liberação de citocinas. Esses dois feitos estão associados com a digestão proteolítica da MEC de células endoteliais (RAMOS, 2006).

A maioria das atividades funcionais associadas com SVMPs está associada com a ruptura da hemostase, essencialmente pro e anti-coagulatório. Mais recentemente, estudos indicaram outras funcionalidades para as SVMP incluindo indução de apoptose e

inflamação. A presença ou a ausência de certos domínios não necessariamente denota capacidade hemorrágica, no entanto em termos de potencialidade, em geral SVMP PIII são as mais potentes. As SVMP P-I são menos hemorrágicas que as SVMP P-IV. Dentro da classe P-I dessas toxinas existe uma grande variedade de atividades biológicas com diferentes potências. A característica estrutural mais diferenciada da classe P-I é a variabilidade do número de resíduos de cisteína observados nas metaloproteinases. A variedade do número de resíduos de cisteínas, acompanhados pelo potencial alternativo de formação de pontes dissulfeto, poderia sugerir a possibilidade para diferentes estruturas terciárias.

Uma nova classificação subdividiu a classe PII e PIII em subclasses que refletem o potencial para o processamento proteolítico assim como a formação de estruturas diméricas.

Análise de seqüências de membros da classe P-II com particular atenção para a posição e número de resíduos de cisteína permitiram a organização da classe P-II em diversas subclasses. Uma subclasse compreende três toxinas que parece não processar o domínio desintegrina do domínio metaloproteinase (Bilitoxina-1, Agkistrina e Jerdonitina). A estrutura primária dessas toxinas tem a característica de encontrar resíduos de cisteínas nas posições 222 e 241, que não são encontradas em outras SVMP P-II. Isto sugere que a presença dos resíduos de cisteína nessas posições impede o processamento proteolítico da desintegrina do domínio metaloproteinase.

A segunda subclasse é representada pela controtorstatina, acostatina-B e lebetase. Proteinases dessa subclasse são caracterizadas pela perda do resíduo de cisteína nas posições 233 e 235. O terceiro grupo é representado pela trigramina, flavoridina, TJM-1 e HR2a. Esta subclasse é caracterizada por terem um resíduo de cisteína na posição 168, mas não tem o resíduo de cisteína na posição 164.

A classe P-III de SVMPs por terem três domínios sugerem uma complexidade funcional nas SVMPs P-III não associada as P-I e P-II. Procurando por posições de resíduos de cisteína no domínio metaloproteinase, o maior fator de diferenciação deste grupo parece ser na posição 195 na região carboxi do domínio metaloproteinase. As toxinas jararagina, acurhagina A e catrocolastatina tem um resíduo de cisteína neste sitio que outros membros dessa classe não o têm. Todas as quatro toxinas, P-IIIa, podem passar por autólise/proteólise durante a secreção. Outros três membros da classe P-III tem demonstrado passar por autólise em condições não fisiológicas, maioria notavelmente em soluções que perdem a estabilização do cátion divalente, cálcio.

A maioria dos domínios metaloproteinase da classe P-III tem sete resíduos de cisteína. Eles podem conservar os resíduos de cisteínas nas posições 126, 166, 173,190 e 206. A presença da sétima cisteína na posição 195 é necessária, mas não é um critério suficiente para o processamento proteolítico de P-III. Além disso, o arranjo das pontes dissulfeto do domínio metaloproteinase de P-III processadas é provavelmente diferente de P-III não processadas.

Por último, duas toxinas diméricas, VAP1 e HV1, subclasses P-IIIb, tem na sua estrutura primária o sétimo resíduo de cisteína conservado na posição 181, indicando que a presença de resíduo de cisteína nessa posição pode ser crítico para a formação de estruturas P-III diméricas.

Há algumas questões como se a classe P-IV verdadeiramente representa uma nova classe ou se é apenas uma estrutura especial de P-III capaz de formar corretamente uma ligação dissulfeto com a proteína tipo lectina tipo-C durante a formação do veneno (FOX, 2005).

### *1.6. Desintegrinas*

A adesão celular à matriz extracelular é parcialmente mediada pela ligação a integrina por reconhecimento do motivo RGD encontrado em alguns componentes da MEC como fibronectina, vitronectina e fibrinogênio. Estes motivos são também encontrados em alguns grupos de pequenas proteínas ricas em cisteínas denominadas desintegrinas (YAMADA, 1991). Estes peptídeos representam uma família de proteínas ricas em cisteínas isoladas de venenos de serpentes e são conhecidas por invadir a interação célula-matriz e célula-célula mediada por integrinas. Este foi um significativo desenvolvimento no estudo de interações entre ligantes através da descoberta, originalmente em venenos de serpentes, de desintegrinas (GOULD, 1990; NIEWIAROWSKI, 1994).

O termo desintegrina foi primeiramente usado em 1990 para descrever uma família de proteína presente no veneno Viperidae que tinha a habilidade de inibir a agregação plaquetária. Estas proteínas foram caracterizadas como não enzimáticas, de pequena massa molecular (7 a 10 kDa) e possuindo uma extraordinária homologia no arranjo de cisteína por toda a estrutura primária. Hoje, quando nos referimos a desintegrinas não estamos nos referindo apenas a proteínas presentes no veneno de serpentes, mas sim a uma classe de proteína presente também em camundongo, rato, vaca, sapo, caranguejo, macaco, drosófila, levedura, porco da índia, e humano. O termo “desintegrina” é usado para descrever algumas seqüências que são ricas em cisteínas, com um alinhamento de cisteína que é homólogo aos encontrados em proteínas do veneno viperide. Uma característica comum mostrada por todas as proteínas parece ser a habilidade de interagir com moléculas de adesão como as integrinas.

Desintegrinas podem ser solúveis ou ligadas à membrana, independente ou incorporada como um motivo dentro da construção de multidomínios da proteína. As



desintegrinas solúveis são encontradas em quatro famílias de serpentes: Atractaspididae, Elapidae, Viperidae e Colubridae (MCLANE, 2004).

A maioria dessas proteínas é sintetizada com o domínio C-terminal de metaloproteinases da classe P-II e são liberadas no veneno como resultado do processamento proteolítico. Algumas desintegrinas existem como domínios Desintegrinas/Rico em Cisteína de metalopeptidase de veneno de serpente da classe P-III. Elas não são normalmente liberadas como proteínas separadas no veneno (MCLANE, 2004). A coexistência na mesma serpente de desintegrinas com motivo conservado RGD e desintegrinas com motivos variável não RGD suporta a hipótese que há duplicação de gene, uma cópia do gene que irá divergir, envolvida na pressão de seleção pela função ancestral enquanto o outro gene duplicado (não RGD) perde o seu papel funcional (MCLANE, 1998).

Há em cada desintegrina, um peptídeo a C-terminal que se acredita ser responsável pelas propriedades adesivas dessas proteínas, arranjadas em um loop formado pelo padrão dissulfeto. Para a maioria das desintegrinas solúveis, esses três aminoácidos são Arginina, Glicina, Ácido Aspártico (RGD), mas recentemente outras descobertas têm demonstrado uma ampla variedade, conduzindo a diferentes significados em função.

Desde que desintegrinas de veneno de serpentes solúveis, não enzimáticas foram descobertas e nomeadas, o termo desintegrina é às vezes reservado para essas, e o termo tipo-desintegrina usado para descrever motivos parecidos encontrados em proteínas desintegrinas/rico em cisteínas, ADAM e SVMPs. O papel atribuído ao domínio desintegrina em algumas dessas proteínas é de uma molécula adesiva.

Estudos estruturais realizados com as primeiras desintegrinas, echistatina e trigramina propuseram que as desintegrinas eram inibidoras de adesão e se estabeleceu que as desintegrinas solúveis e metaloproteinases de veneno são derivadas de proteólise de um precursor comum. Proteínas de veneno viperide são compostas de quatro distintos domínios,

com o segundo domínio contendo o sítio metaloproteinase ativo e o terceiro contendo a seqüência RGD inibitória de integrina. A conformação da desintegrina é essencial para a sua atividade e a seqüência RGD é encontrada no topo da alça flexível do loop. (MCLANE, 2004).

Originalmente as desintegrinas foram divididas em três grupos, mas nessa classificação não incluía as desintegrinas diméricas (MCLANE, 1998). Atualmente as desintegrinas derivadas de veneno podem ser classificadas em cinco grupos, baseados no seu comprimento e número de pontes de dissulfeto: pequenas, médias e longas, diméricas e o domínio desintegrina de metaloproteinase da classe P-III.

Desintegrinas pequenas alcançam em comprimento de 41 aminoácidos a 52 aminoácidos e possuem 4 pontes dissulfeto. Uma exceção pode ser a acutina de *Deinagkistrodon acutus*, cujo sequenciamento de aminoácidos encontrou apenas sete cisteínas (SMITH, 2002).

As desintegrinas de tamanho médio são a maioria. Das 30 diferentes desintegrinas caracterizadas, a maioria pertence a esse grupo, com aproximadamente 70 aminoácidos e seis pontes de dissulfeto. Desintegrinas desse grupo cuja função tem sido caracterizada incluem trigamina, rodostomina e barbourina (CALVETE, 1997).

A saxitilina isolada de *Gloydus saxatilis* evidencia a presença de três pontes dissulfeto, Cys21-Cys35, Cys29-Cys59 e Cys47-Cys67. Essas pontes dissulfeto são fortemente relacionadas com a habilidade de bloquear a ligação de  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_3$  ao fibrinogênio e a matriz extracelular. Essas ligações de dissulfeto também revelam ser importante para a manutenção da estrutura funcional de moléculas protéicas. Por outro lado, as pontes dissulfeto de Cys6-Cys15 e Cys8-Cys16 não parecem ser críticas para a estrutura e função da saxitilina (CALVETE, 2002; MORENO-MURCIANO, 2003).

A presença de duas cisteínas formando a oitava ponte dissulfeto é mais uma característica encontrada em ADAMs e em metaloproteinases classe P-III.

Desintegrinas diméricas constituem o mais recente grupo descoberto, e foram as proteínas que começaram a ampliar as fronteiras do que se pode chamar de desintegrinas clássicas. Este grupo é formado de desintegrinas diméricas, com 4 pontes dissulfeto intracadeia e 2 pontes dissulfeto intercadeia. O primeiro contraste óbvio com as monoméricas é a presença de duas pontes dissulfeto intercadeia despeito da perda de uma cisteína empareada em alguma subunidade. Outra característica única é a existência de homodímeros e heterodímeros, e uma variedade de resíduos presentes no motivo adesivo de cada cadeia (MORENO-MURCIANO, 2003, MCLANE, 2004).

Esta diversidade é diretamente associada com a seletividade do receptor de cada desintegrina em cada grupo, e a proposta do arranjo tridimensional das duas cadeias parcialmente contribuem para essa seletividade (MCLANE, 2004). Homodímeros nesse grupo incluem VLO4 e VA6 assim como a contortostatina e CC5, enquanto VLO5, EC3, EMF10 são heterodímeros isolados de diversas serpentes (MCLANE, 2004). As desintegrinas homodiméricas contêm a seqüência RGD em ambas as cadeias, enquanto desintegrinas heterodiméricas exibem mais variedade de sítios ligantes. Desintegrinas heterodiméricas como EC3 isolada de *Echis carinatus* carregam o motivo VGD na cadeia A e o tripeptídeo MLD na subunidade B (COELHO, 2004).

Com o aumento do número de desintegrinas e tipo-desintegrinas sendo expressas por tecnologia recombinante, há sempre a preocupação, quando um sistema de expressão bacteriano é usado e se essas proteínas altamente ligadas por pontes dissulfeto estarão fora de conformação afetando a atividade. Pesquisadores têm demonstrado que em outros sistemas de expressão como *Pichia pastoris* e em *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína final apresenta a mesma atividade comparada com a desintegrina nativa (MCLANE, 2004).

Quando imobilizados em uma superfície, peptídeos contendo a seqüência peptídica RGD promovem a ligação celular de maneira similar a fibronectina, entretanto em solução o mesmo peptídeo pode inibir a esta ligação à fibronectina, ao mesmo peptídeo, ou outra proteína contendo RGD. Mudanças nos peptídeos como pequenas alterações como a troca de alanina por glicina e ácido aspártico no grupo RGD, elimina essa atividade (RUOSLAHTI, 1991).

A potência dessas moléculas na inibição da interação ligante-integrina é provavelmente uma função de ambas conformações da seqüência RGD e os aminoácidos que estão adjacentes flanqueando a seqüência RGD no peptídeo. Isto contribui para a especificidade desses peptídeos a diferentes integrinas, também resíduos não conservados dentro desses peptídeos podem também contribuir para a seletividade das integrinas.

Na seqüência de desintegrinas são encontradas em certas posições resíduos conservados de cisteínas e a conservação na localização da seqüência RGD. Todas as desintegrinas têm uma alta proporção de cisteína em ligações dissulfeto e mostram alto grau de identidade com relação ao arranjo de cisteínas, exceto pela cisteína extra encontrada a C-terminal da molécula de desintegrinas pequenas (GOULD, 1990, MCLANE, 1998).

Acredita-se que a seqüência RGD representa um sitio de reconhecimento das desintegrinas, desde que é conservada em todas a molécula e desde que alterações nesses aminoácidos mudam a atividade dos peptídeos. Este argumento está de acordo com a teoria de que a apropriada conformação da seqüência RGD é essencial para adesão de proteínas celulares a integrinas. Também além dos aminoácidos adjacentes ao sitio RGD, a conformação espacial estabelecida pelas pontes de dissulfeto contribui para a potencialidade das desintegrinas (GOULD, 1990). Uma serie de mutações na região do loop tem demonstrado que o resíduo de prolina é o resíduo mais freqüentemente encontrado em

segmentos que flanqueiam sítios de interações proteína-proteína e sugere que isto ajude na apresentação do sítio de interatividade (MCLANE, 2004).

As desintegrinas parecem usar mecanismo comum de inibição envolvendo o tripeptídeo R/K GD, motivo de ligação a integrina presente no topo da alça móvel (CALVETE, 1996) e exposta, cuja raiz teve recentemente caracterizada e encontrada sendo duas rígidas ligações de hidrogênio (OJIMA, 1995). Assim, as atividades das desintegrinas dependem do apropriado pareamento de 8 a 14 cisteínas por pontes de dissulfeto que permitem o *loop* RGD na conformação ativa (CALVETE, 1996).

Estudos experimentais de estrutura de desintegrinas têm sido limitada primeiramente pela grande quantidade de proteína necessária, ainda baixa produção tanto do veneno bruto como por técnicas recombinantes. Em adição, estudos de NMR de desintegrinas monoméricas sugerem que há uma estrutura secundária mínima e máxima flexibilidade do *loop* RGD, as quais dificultam a formação do cristal. Maior sucesso na cristalização tem sido experimentado com desintegrinas diméricas, talvez devido a mais complexa e maior tamanho dessas proteínas comparadas com formas monoméricas.

Desde que essas proteínas foram isoladas de veneno de serpentes cuja mordida causa hemorragia, era lógico examinar primeiro os efeitos nos componentes da cascata de coagulação e compartimento vascular. De fato, a habilidade em inibir a agregação plaquetária induzida por agonista tornou-se uma marca característica pelo qual essas proteínas são comparadas.

Havia muito entusiasmo na década de 90 pelas companhias farmacêuticas no propósito de desenvolver agentes terapêuticos antiplaquetários. A descoberta que a seqüência KGD em barbourina era responsável por sua seletividade a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mais que  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_5\beta_1$  que permitiu o desenvolvimento de epitafibatide (Integrilin<sup>®</sup>), um heptapeptídeo sintético cíclico baseado no motivo KGD.

Desintegrinas derivadas de metalopeptidase da classe P-II são definidas como aquelas que ocorrem naturalmente no veneno e que possuem um arranjo conservado de cisteína, a habilidade de ligar integrinas em maneira dose dependente, e que tem o motivo R/K/M/W/VGD, MLD, MVD ou K/RTS dentro do qual é o loop RGD. Este motivo e resíduos que o flanqueiam são críticos para a seletividade das desintegrinas e afinidade para a ligação no receptor, como é demonstrado usando mutagênese sitio dirigida para eristostatina, elegantina, echistatina e rodostomina. As desintegrinas demonstram uma ampla variedade de seletividade a ligantes.

As desintegrinas têm sido extensivamente estudadas como o mais potente ligante de receptores plaquetários e outras células. Como tal, elas não tem apenas providenciado percepção nas relações estrutura-função, mas sendo proposto como exemplo de químico natural.

Ambas salmosina-1 recombinante e natural inibem a ligação a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ao fibrinogênio com valores de  $IC_{50}$  de 2.2 nM e 4.5 nM, aproximadamente cinco vezes menor que o da flavoridina, que era inicialmente a mais potente desintegrina.

Dois domínios desintegrinas de classe P-III têm sido demonstrados como inibidor de ligação ao colágeno pelo receptor  $\alpha_2\beta_1$ . Alternagina-C seletivamente inibe a adesão a K562 transfectada a  $\alpha_2\beta_1$  ao colágeno, enquanto é inefetiva em células que expressam outros ligantes. O domínio desintegrina rico em cisteína da jararagina inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno tipo-I e o conseqüente evento de sinalização pela ligação a integrina. Ao contrario, quando incubamos com fibroblastos, o domínio desintegrina rico em cisteína da jararagina é capaz de ligar a  $\alpha_2\beta_1$  e induzir eventos de sinalização como up-regulação de MMP-1 e MT1-MMP ( MOURA-DA-SILVA,2003).

EC3, um heterodímero, tem sido descrito como um potente inibidor de integrinas  $\alpha_4$ , inibindo a adesão de células expressando  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_4\beta_7$  ao ligante natural VCAM-1.

Desintegrinas tem providenciado percepção do funcionamento celular de uma variedade de células não vasculares. Mais frequentemente estudados são os osteoclastos, que altamente expressam a integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Este receptor participa de importantes papéis na ligação de osteoclastos na reabsorção de superfície.

Com células de câncer, o maior uso das desintegrinas *in vivo* tem sido em modelos experimentais de metástase em camundongos, onde a proteína purificada do veneno de serpente é injetada com células de câncer (intravenosa, intraperitoneal), e tecidos são avaliados após autopsia para a presença de tumor. Introdução hematogênea de células de câncer (normalmente melanoma) em conjugação com desintegrinas têm demonstrado que desintegrinas podem participar de um papel protetor através da inibição da dispersão do tumor. Este fenômeno é dose-dependente, e reflete a seletividade da desintegrina pela integrina envolvida na progressão do câncer.

Desintegrinas tem recentemente sido usadas na investigação de morte celular programada (apoptose) de linhagens de células endoteliais, condrócitos e célula de rim canino (MCLANE, 2004).

Por causa da sua alta afinidade e seletividade por integrinas, as desintegrinas podem ser consideradas antagonistas de moléculas de adesão. Entretanto, recentes descobertas mostraram que desintegrinas são capazes de interagir com células e ativar vias de sinalização mediada por integrinas, indicando que peptídeos contendo RGD e ricos em cisteína podem ser considerados ambos antagonistas ou agonistas de funções relacionadas com integrinas, dependendo do tipo de célula (COELHO, 2004).

### *1.6.1 Desintegrinas Não-RGD (Desintegrinas-like) e seus efeitos*

Hemorragia ou sangramento é um fenômeno comum em vítimas de envenenamento Crotalidae e Viperidae. Os principais fatores responsáveis são as toxinas hemorrágicas, e há outros fatores secundários, como os componentes do veneno que induzem a um estado de incoagulabilidade sangüínea, assim como enzimas que liberam cininas.

Recentemente, domínios tipo-desintegrinas têm sido observados tanto em proteínas quanto ao nível de cDNA de diversas metaloproteinase hemorrágicas de veneno (BJARNASON, 1994; MCLANE, 1998).

Dados demonstram que as mais potentes hemorraginas pertencem à classe P-III, contendo os domínio tipo desintegrinas e rico em cisteína assim como o domínio protease em sua molécula. Embora a principal razão para hemorragia seja provavelmente devido à ruptura proteolítica da membrana basal, tem tido diversas contradições entre a potencialidade proteolítica e hemorrágica. Isto já está bem estabelecido que o domínio tipo-desintegrina é um inibidor da agregação plaquetária pela especificidade de ligação a superfície plaquetária do receptor de fibrinogênio,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e o receptor de colágeno  $\alpha_2\beta_1$ . Recentemente, foi demonstrado que o domínio rico em cisteína está também envolvido na inibição da agregação plaquetária estimulada por colágeno. Tem sido especulado que o domínio tipo desintegrina também modula a atividade metalopeptidase alvo de hemorraginas a um sitio particular de ação de ligação da enzima ao seu substrato. (PETRETSKI, 2000).

Aparentemente, em SVMP P-III, os domínios agem sinergisticamente com o domínio catalítico, aumentando hemorragia pela inibição da agregação plaquetária e provavelmente por serem alvo de enzimas os componentes relevantemente fisiológicos da



membrana basal. Conseqüentemente, atividade hemorrágica de SVMP PIII é normalmente 10 vezes maior que de SVMP P-I, desprovido de domínio tipo desintegrina rico em cisteína (BJARNASON, 1994). Há a sugestão que a porção C-terminal do domínio tipo desintegrina é necessária para a direção da hidrólise de componentes da membrana basal induzida pela jararagina. Isto representa uma boa evidência da interação conformacional entre os domínios catalíticos e tipo desintegrina de SVMP e contribui para o entendimento das relações estrutura/função e mecanismos envolvidos na ação dessas enzimas (TANJONI, 2003). Entretanto, é sabido que é necessário à estrutura conter no domínio desintegrina a seqüência E/DCD que pode explicar a especificidade de ligação a integrinas (MOURA-DA SILVA, 1999).

A ALT-C é uma proteína tipo desintegrina maior que uma desintegrina RGD, com cerca de 30 kDa e tem um domínio C-terminal extra, rico em cisteína (SOUZA, 2000) e é um potente inibidor de colágeno através da ligação a integrina  $\alpha_2\beta_1$  (SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2005). Esta desintegrina promove alterações na rede de actina em um aumento do conteúdo de F-actina, sugerindo que o efeito da ALT-C em neutrófilos pode envolver vias mediadas por integrina (MARIANO-OLIVEIRA, 2003).

Tem sido demonstrado que a jararagina, uma metaloproteinase/desintegrina homologa de *Bothrops jaracaca* mimetiza a interação ao colágeno com fibroblasto resultando em uma up-regulação na integrina  $\alpha_2\beta_1$  e genes de MMP-1 e MT1-MMP

Então, proteínas tipo-desintegrinas podem ativar integrinas permitindo modificações significantes em eventos celulares e isto pode ser uma via diferente das desintegrinas RGD. Entretanto, esses eventos não são bem entendidos ainda. Foi sugerido que a jararagina age como agonista de colágeno pela integrina  $\alpha_2\beta_1$ , causando a ativação dessa integrina e produzindo eventos de sinalização celular tipo colágeno com uma up-regulação de MMPs. Uma vez que ALT-C não tem o domínio metaloproteinase, o resultado evidencia que

o domínio desintegrina e rico em cisteína são responsáveis pela ativação da integrina (COMINETTI, 2004).

Esta desintegrina-símile, ALT-C, induz um significante aumento em diversos genes relacionados com o controle do ciclo celular, incluindo VEGF e outros fatores de crescimento. A expressão de VEGF pode explicar o efeito positivo de ALT-C na proliferação de HUVEC. A interação de ALT-C com via de sinalização por ativação de integrina em algumas linhagens de células tumorais interferem com sua migração e mecanismos de adesão, e esses efeitos podem ser modulados dependendo da concentração da desintegrina (SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2005).

Jararagina é uma toxina versátil, alvo de importantes elementos envolvidos na hemostase, como proteínas de coagulação, plaquetas e células endoteliais. Estas atividades biológicas são associadas com a intensa hemorragia induzida após a sua injeção em experimentos animais e observados em pacientes envenenados de *Bothrops alternatus*. Além disso, a ação da jararagina em componentes endógenos e sistemas celulares podem ambos exacerbar a severidade e compromisso na cicatrização de danos de tecidos como um resultado de envenenamento local. Entre as maiores características da jararagina na hemostase está a sua habilidade em induzir hemorragia na ruptura da membrana basal e integridade de células endoteliais e também sua atividade no bloqueio da interação da integrina  $\alpha_2\beta_1$  com colágeno, ambos pela ligação ao domínio  $\alpha_2$  e clivagem da integrinas  $\alpha_2\beta_1$  (MOURA-DA-SILVA, 2001).

Resultados sugerem que a jararagina promove a ruptura da sinalização de adesão focal, seguida pela perda da ancoragem e apoptose (TANJONI, 2003).

Dados suportam a hipótese que a jararagina, devido a sua atividade proteolítica, induz o estado apoptótico seguindo os mecanismos: (1) degradação da superfície celular e da matriz extracelular permitindo a ruptura da via de sinalização de integrinas e

então iniciar anoikis, (2) “*up-regulation*” da via MAPK p38 começando com a *up-regulation* de IL-1 com conseqüente aumento da produção de citocinas que permite o compromisso da via de receptor de morte, e (3) *up-regulation* da via de receptor de morte como um resultado do aumento de receptores de morte celular pelos seus ligantes (GALLAGHER, 2005).

A ação das SVMPS em células endoteliais pode envolver no mínimo dois mecanismos independentes: a catálise de componentes da adesão focal permitindo a anoikis e/ou um efeito direto através da transdução de sinal mediado por receptor pelo domínio desintegrina. O resultado do efeito apoptótico irá então refletir o balanço entre a ação catalítica e atividade desintegrina. Efeito da jararagina em células endoteliais induz uma rápida mudança na dinâmica do citoesqueleto com a retração celular, que é seguida pelo destacamento e apoptose. Esses efeitos são provavelmente participantes de uma severa coagulopatia e lesões hemorrágicas (TANJONI, 2003). Estudos terapêuticos têm que se basear não focando apenas a inibição da ação proteolítica das SVMP, mas também considerar como agentes que podem atenuar ou bloquear a apoptose, inflamação e via p38 MAPK (GALLAGHER, 2005).

Peptídeos sintéticos baseados em seqüências de domínio desintegrina derivadas der SVMPS da classe P-III tem demonstrado atividade de inibição da agregação plaquetária, sugerindo um papel para esse domínio tipo desintegrina na inibição da agregação plaquetária.

Diversos estudos têm mostrado que peptídeos sintéticos baseados em seqüências que contem ECD na seqüência do domínio tipo-desintegrina e também na seqüência RKKH do domínio enzimático, ambos seletivamente inibem a interação plaqueta/colágeno. Entretanto, outros estudos têm demonstrado que domínios rico em cisteína recombinantes da atrolisina A também inibem a agregação plaquetária induzida por colágeno. Ainda não se sabe se sítios do domínio são ou não responsáveis por essa seletividade (MOURA-DA-SILVA, 2001).

Já foi demonstrado que domínios ricos em cisteína de metaloproteinase P-III são capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno. Para localizar essa região no domínio rico em cisteína de metalopeptidase P-III foram desenhados peptídeos baseados no domínio rico em cisteína. Esses peptídeos tiveram a atividade biológica identificada. Duas regiões do domínio rico em cisteína mostraram atividade inibitória na agregação plaquetária com colágeno, enquanto seqüências misturadas desses peptídeos na forma inativos são usadas como controle (KAMIGUTI, 2003).

### ***1.6.2 Os papéis das Desintegrinas RGD***

Venenos Viperidae contêm classes de proteínas que interferem com a hemostasia e adesão celular: proteínas de ligação a GPIIb/IIIa que inibem a ligação do fator de Von Willebrand a plaquetas e pode inibir ou induzir agregação plaquetária, as hemorraginas além das serinoproteases e outras classes relacionadas.

As desintegrinas eram originalmente definidas como de baixo peso molecular, rico em cisteína que continha um loop RGD/KGD mantido em apropriada conformação pelas pontes de dissulfeto e potentes inibidores da agregação plaquetária. Tem sido proposto que as desintegrinas são formadas por processamento proteolítico de um precursor homólogo da classe P-II de SVMPs (MCLANE, 1998).

Desintegrinas inibem a interação célula-matriz e célula-célula. De fato, bloqueio da integrina  $\alpha v \beta 3$  com anticorpos específicos, peptídeos RGD ou desintegrinas contendo a seqüência RGD, tem um efeito inibitório na adesão endotelial, mobilidade,

invasão e formação do tubo, e esse tratamento também bloqueia a habilidade das células endoteliais serem ativadas por fatores angiogênicos de crescimento (GOLUBKOV, 2003).

A maioria das desintegrinas são potentes inibidores da agregação plaquetária pela ação como antagonistas do receptor de fibrinogênio (integrina  $\alpha_{11b}\beta_3$ ). Esta atividade é devida à presença de motivos adesivos RGD dentro de um “loop” de aminoácidos mantido por pontes dissulfeto (CALVETE, 2005). Vitronectina, fibrinogênio, colágeno tipo I, fator de Von Willebrand são proteínas com seqüências RGD e suas interações com células podem ser inibidas por peptídeos contendo RGD (RUOSLAHTI, 1991). As desintegrinas ligam se com maior afinidade ao ligante natural, fibrinogênio, do que o próprio receptor plaquetário (MCLANE, 1998). Como um antagonista de integrinas na membrana celular, desintegrinas podem agir em muitos processos biológicos incluindo agregação plaquetária, angiogênese, invasão tumoral e destruição de ossos (ZHOU, 2004).

A agregação plaquetária exerce um importante papel na hemostase e ocorre pela interação do complexo receptor GP IIb-IIIa, que é uma integrina da membrana celular das plaquetas, na qual a seqüência RGD do fibrinogênio é essencialmente necessária. Inicial ligação da plaqueta a estruturas subendoteliais expostas e subsequente coesão plaqueta-plaqueta são tipicamente identificadas como dois passos da formação dos trombos, respectivamente adesão e agregação.

Em adição a inibição da agregação plaquetária, algumas desintegrinas têm mostrado inibição experimental de metástase, por ser um processo dependente de integrina (SOUZA, 2000). As desintegrinas não são somente específicas para  $\alpha_{11b}\beta_3$  mas elas também podem ligar em outras integrinas como receptor de vitronectina  $\alpha_v\beta_3$  e receptor de fibronectina  $\alpha_5\beta_1$  (ZHOU, 1999).

A jarastatina, uma desintegrina RGD isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, foi capaz de inibir migração de neutrófilo *in vivo* e *in vitro* e promover a reorganização de actina do citoesqueleto (MARIANO-OLIVEIRA, 2003).

Extensiva pesquisa focada em desintegrinas RGD e suas interações com a integrina plaquetária  $\alpha_{IIb}\beta_3$  permitiu o desenvolvimento de novas drogas anti-plaquetária e anti-trombótica baseados na estrutura da desintegrina (MCLANE, 1998).

A seqüência RGD está longe de ser a mais efetiva e mais freqüentemente seqüência peptídica causadora da estimulação de adesão celular e superfícies sintéticas. Isto está baseado na grande distribuição e uso por todo o organismo de sua habilidade de endereçamento mais que de receptor de adesão celular, e seu impacto biológico no ancoramento celular, comportamento e sobrevivência (HERSEL, 2003).

Desintegrinas têm sido usadas como antagonistas de tumores e angiogênese. Várias desintegrinas têm mostrado inibição da angiogênese *in vitro* e *in vivo* por indução da apoptose. Entretanto, o mecanismo molecular das desintegrinas causadores da apoptose não foi completamente identificado ainda (ALIMENTI, 2004).

Estudos de desintegrinas têm revelado novos usos no diagnóstico de doenças cardiovasculares e desenhos de agentes terapêuticos em trombose arterial, osteoporose e angiogênese relacionado com crescimento tumoral e metástase. Recentemente, tem sido demonstrado que as desintegrinas inibem espontaneamente a angiogênese associada ao crescimento do tumor (WU, 2003, YANG, 2005).

Desintegrinas de veneno são excelentes instrumentos para a investigação da função de integrinas. Interferência com estes receptores e seus ligantes é o principal mecanismo pelo quais essas proteínas contribuem para a toxicidade de veneno. Entretanto, a compreensão do mecanismo preciso da ação desses componentes e a estrutura mínima

requerida para sua ação será estender sua aplicação no estudo da fisiologia da célula (KAMIGUTI, 1998).

### *1.7 Integrinas*

A adesão seletiva entre células e delas à matriz extracelular determina desde a formação de um tecido até eventos como migração celular.

A especificidade da adesão celular vem da expressão combinatória e interações entre um grande, mas não ilimitado número de receptores de adesão nos contatos células-células e adesão célula-matriz (HYNES, 1999). A ligação de células ao seu redor é importante na determinação da forma e manutenção da função celular e integridade tecidual.

A matriz extracelular (MEC) é composta de uma rede de proteínas insolúveis, carboidratos e fatores de crescimento que são secretados pelas células, principalmente fibroblastos e que enche a maioria dos espaços intercelulares. Matrizes extracelulares em diferentes localizações no corpo consistem de diferentes combinações de colágeno, proteoglicanas, elastina, ácido hialurônico e várias glicoproteínas tais como fibronectina e laminina.

Em adição aos seus papéis na ligação a seus vizinhos ou a MEC, receptores de adesão celular têm maiores efeitos em muitos aspectos do comportamento celular tais como forma celular e polarização, organização de citoesqueleto, mobilidade celular, proliferação, sobrevivência e diferenciação (HYNES, 1999).

A adesão celular regula o desenvolvimento embrionário pelo controle da migração celular, crescimento, e diferenciação. Adicionalmente, a adesão contribui para o

processo de transformação maligna, inflamação, homeostase e reconhecimento imune (SURÁZYŃSKI, 2005).

Eventos de adesão celular são mediados por receptores transmembrana que pertencem a muitas famílias de supergenes. Estes incluem as integrinas, imunoglobulinas, caderinas, selectinas, integrinas. As integrinas são responsáveis pelo reconhecimento e adesão de células a elementos da matriz extracelular, assim como as interações célula-célula (SURÁZYŃSKI, 2005).

As imunoglobulinas representam um grupo de proteínas transmembranares que contêm repetidos domínios tipo-Ig e mediam adesão célula-célula heterofílica ou homofílica (STRÖMBLAD, 1996). É a segunda maior classe de receptores de adesão, caracterizada pela presença de vários números de domínios (HYNES, 1999).

As caderinas são um grupo distinto dos domínios tipo-Ig. Elas são glicoproteínas transmembrana de adesão célula. Caderinas N humanas estão presentes em baixas concentrações nas células endoteliais.(STRÖMBLAD, 1996). As caderinas são primeiramente e centralmente envolvidas na adesão célula-célula. As caderinas mediam adesão hemofílica dependente de cálcio entre células através de repetições caderinas mais distantes. Análises estruturais e funcionais sugerem que a unidade funcional é um dímero. Assim como em outros receptores, o agrupamento de caderinas é importante para a suas funções, e múltiplas interações dímero-dímero parecem providenciar suficiente avidéz para mediar adesão célula-célula (HYNES, 1999).

As selectinas são outro grupo de glicoproteínas transmembrana de adesão celular, incluindo E-selectina, L-selectina e P-selectina. E-selectina e P-selectina estão em duas diferentes formas: forma transmembrana, mediando interações célula-célula e na forma solúvel (STRÖMBLAD, 1996). Selectinas e seus ligantes participam de papel crucial na



adesão de leucócitos ao endotélio, onde a sua colaboração com integrinas e receptores de Ig são mais bem entendido na especificidade de adesão celular.

A maior família de receptores de adesão são as integrinas. Diferentes dos outros, as integrinas são heterodiméricas. As maiorias das integrinas são predominantes ou exclusivamente receptoras para proteínas de MEC, mas alguns podem participar de importantes papeis na adesão celular heterotípica (HYNES, 1999).

As integrinas representam um grupo de mais de 20 receptores transmembrana que pode formar receptores heterodimericos para varias proteínas extracelulares, como fibronectina, laminina, tenascina, trombospondina, e colágeno (tabela 1). Receptores de adesão tipo integrinas podem participar de importantes papeis no desenvolvimento de metazoários (HEINO, 2000; HYNES, 2002). Integrinas são compostas da associação de cadeias  $\alpha$   $\beta$  não-covalentemente. Pelo menos 15 subunidades  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$  tem sido identificadas. Essas subunidades de integrinas podem combinar-se dando uma vasta variedade de heterodímeros com distinto as propriedades celulares e adesivas (BROOKS, 1996) (tabela 1 e figura 8). As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são produtos de genes separados e são mutuamente interdependentes para o correto processamento e posicionamento na superfície da membrana celular. Em geral, integrinas realizam suas funções pela interação com componentes de matriz extracelular insolúveis ou proteínas de superfície de outras células ligando elementos intracelulares incluindo o citoesqueleto, envolvidos nos eventos de sinalização bidirecional. Muitos dos casos das interações são cátions dependentes (LOFTUS, 1994).

Tabela 1 Integrinas e seus ligantes na MEC

Integrinas e seus ligantes		Ligantes e Contra-Receptor
$\beta$	$\alpha$	
$\beta 1$	$\alpha 1$	Colágeno, Laminina
	$\alpha 2$	Colágeno, Laminina
	$\alpha 3$	Colágeno, Laminina, Fibronectina, Epiligrin, Entactin
	$\alpha 4$	Fibronectina, VCAM-1
	$\alpha 5$	Fibronectina, L1-CAM, Tenascina, Invasina
	$\alpha 4$	Laminina, Merosina, Kalinina, Invasina
	$\alpha 7$	Laminina
	$\alpha 6$	Tenascina, Fibronectina, Vitronectina
	$\alpha 9$	Colágeno Tipo I, Laminina, Tenascina
	$\alpha v$	Vitronectina, Fibronectina, Osteopontina
$\beta 3$	$\alpha L$	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	$\alpha II$	ICAM-1, Fibrinogênio, Fator X, C3b
	$\alpha X$	Fibrinogênio, C3b
$\beta 3$	$\alpha v$	Vitronectina, Osteopontina, Fibrinogênio, fator de von Willebrand, Fibronectina, colágeno tipo I e VI e trombospodina
	$\alpha III$	Fibrinogênio, Fibronectina, Vitronectina, Fator de von Willebrand
$\beta 4$	$\alpha 4$	Laminina, Kalina
$\beta 5$	$\alpha v$	Vitronectina, Osteopontina, fibronectina
$\beta 4$	$\alpha v$	Fibronectina
$\beta 7$	$\alpha 4$	Fibronectina, VCAM-1, Ma
	$\alpha E$	
$\beta 8$	$\alpha v$	Fibronectina, Vitronectina

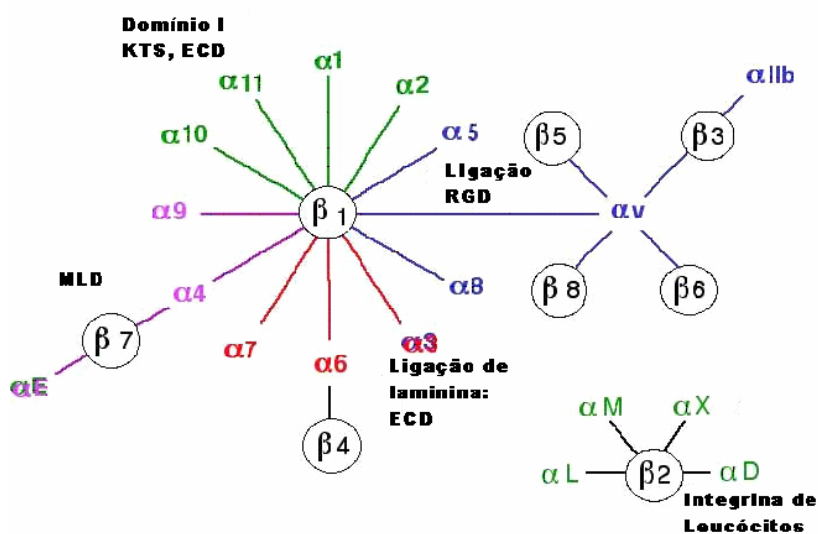
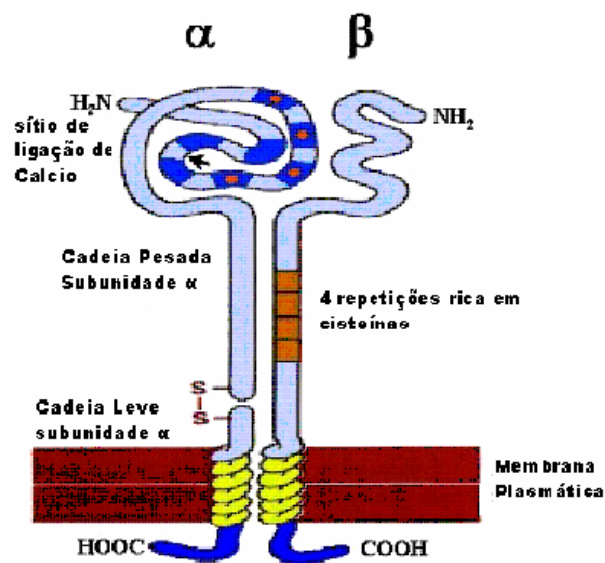


Figura 8. Diagramas de família de integrinas e diferentes motivos tripeptídeos de interações integrina-ligante.

Extraído e modificado de [http://www.chuv.ch/cpo\\_research/integrins.html](http://www.chuv.ch/cpo_research/integrins.html). Acesso 21/09/2006.

Com base na seqüência de aminoácidos, cada subunidade de uma determinada integrina parece conter um grande domínio extracelular, segmento transmembrana, e um pequeno domínio citoplasmático. Sabe-se que os receptores entre eles, as integrinas, requerem cátion divalentes,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ , para a interação com seus ligantes. Em especial o  $\text{Ca}^{+2}$  tem mostrado ligar-se a uma das subunidades  $\alpha$ . A seqüência de aminoácidos do domínio extracelular da subunidade  $\alpha$  de cada integrina contém diversos sítios que são homólogos aos sítios de ligação ao  $\text{Ca}^{+2}$  em outras proteínas como calmodulina e essas seqüências (figura 9).



**Figura 9** Estrutura das subunidades de uma Integrina.

Extraído e modificado de <http://www.medicine.ox.ac.uk/ndog/mardon/integrin.htm>. Acesso 21/09/2006.

O domínio extracelular das integrinas contém uma característica interessante na seqüência cerca de  $\frac{1}{4}$  da subunidade  $\beta$  consiste de estruturas repetidas com alto conteúdo de cisteína (20%). Esta característica é obviamente responsável pela característica de mudança na mobilidade eletroforética depois da redução.

As seqüências de aminoácidos das integrinas sugerem fortemente que ambas as subunidades transpõem a membrana das células porque cada polipeptídeo tem um segmento com características de domínios transmembrana perto do seu C-terminal. A fosforilação do domínio citoplasmático pode regular as funções de ligação destes receptores de adesão. Um mecanismo envolvendo fosforilação pode explicar a aparente falta de função de receptores na transformação de células malignas que desaderem da matriz extracelular e desorganização o citoesqueleto (RUOSLAHTI, 1991).

A família de receptores integrinas é expressa em uma ampla variedade de células. Enquanto membros específicos como integrinas  $\beta_2$ , tem sua distribuição restrita a leucócitos e algumas células de origem hematopoiéticas, outros membros  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  e  $\alpha_5$ , são mais amplamente distribuídos. Enquanto muitas integrinas são expressas constitutivamente, outras têm mostrado serem diferencialmente reguladas. Recentemente, foi demonstrado que a integrina  $\alpha_v\beta_3$  é apenas expressa minimamente em células quiescentes de vasos sanguíneos, mas é significativamente *up*-regulada durante a angiogênese *in vivo* (BROOKS, 1996).

Distintas integrinas reconhecem diferentes domínios na mesma molécula podendo transmitir sinais que diferentemente regulam proteases de degradação de matriz (BROOKS, 1996).

Integrinas não apenas participam de adesão celular e eventos de re-organização do citoesqueleto necessários para a migração celular, mas também mediam sinalização transmembrana da MEC às células. Sinais induzidos por integrinas incluem troca de  $H^+$ , influxo de  $Ca^{2+}$ , eventos de fosforilação de tirosina, serina e treonina, assim como alteração do metabolismo de fosfosinosídeo. Em muitos casos, esses sinais têm sido ligados à regulação da expressão gênica e contribuído para mecanismos como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (STRÖMBLAD, 1996). Crucial para o efeito dos receptores de adesão na organização intracelular e mobilidade celular é o fato que seus domínios se conectam ao

citoesqueleto (HYNES, 1999). A organização de estruturas de actina associada a integrinas é regulada pelo mecanismo complexo governado por membros da família Rho de GTPase associada a Ras. A regulação coordenada da afinidade de ligação à integrina e a dinâmica de filamentos de actina são de fundamental importância não apenas na adesão celular, mas em toda a arquitetura e mobilidade celular, e em eventos de sinalização dependente de integrinas.

Integrinas estão diretamente conectadas ao citoesqueleto e influenciam muitos aspectos na mobilidade celular. Elas podem também funcionar como moléculas de transdução de sinal em modo *outside-in* e são modulados na ligação de afinidade por outras moléculas (*inside-out*) através de domínio intracelular. Entretanto, integrinas estão também envolvidas em vias de transdução de sinais que podem ser afetados por antagonistas de integrinas (BECKER, 2003).

Conexões ao citoesqueleto podem ativar integrinas, mudando as conformações e aumentando sua habilidade de ligação aos ligantes. Essa habilidade de controle de afinidade de integrinas é crucial para a propriedade de adesão celular e é conhecida como sinalização *inside-out*.

As integrinas são bem conhecidas por dispararem um repertório de sinais de transdução assim como receptores de fatores de crescimento. De fato, tem sido mostrado que a cauda citoplasmática das subunidades podem interagir com componentes específicos do citoesqueleto como actina- $\alpha$ , talina e vinculina. Estas distintas interações proteínas-proteínas podem potencializar inúmeros eventos de sinalização transmembrana.

Seus efeitos incluem ativação de família de Rho GTPase permitindo mudanças na organização do citoesqueleto, ativação de vias de MAPK e ativação de várias proteínas e lipídeos quinases. Essas vias de sinalização permitem as integrinas influenciar a progressão do ciclo celular, sobrevivência celular e expressão gênica na adição de seus efeitos na adesão

celular e morfologia. De fato, a maioria das células não pode proliferar ou sobreviver sem elas estarem aderidas a um substrato\_ processo chamado de dependência de ancoragem.

Alteração nas propriedades de reconhecimento como características de células de câncer, e regulação da adesão de células sanguíneas é primordial para a hemostase, trombose, tráfego de leucócito e inflamação (HYNES, 1999).

Como essas moléculas da MEC são conhecidas componentes do microambiente vascular, sua expressão é temporal e espacialmente regulada durante a cascata angiogênica. Mas, os níveis de expressão, distribuição e integridade das proteínas da matriz específica podem mudar, permitindo significantes variações na composição protéica de MEC (BROOKS, 1996).

Estudos preliminares têm demonstrado interações entre integrinas e receptores de fatores de crescimento ligados à membrana. A MEC induz o agrupamento de receptores de integrinas acompanhado pelo recrutamento de receptores de fator de crescimento a complexos de adesão focal, resultando em ativação sinérgica de cascatas de sinalização intercelular.

Para estabelecer um apropriado fenótipo de diferenciação, é essencial que as interações entre receptores de crescimento, caderinas, integrinas e MEC sejam coordenadas.

Interações MEC - integrinas são capazes simultaneamente de modular a morfologia celular assim como ativação de cascatas de sinalização. Deste modo pode ser esperado que ambos, MEC e integrinas, sejam essenciais e podem ser inicialmente ligados em ordem para estabelecer e manter os diferentes fenótipos (BOUDREASU, 1998).

Um modelo para estudar adesão à MEC são as adesões focais (FA). As FAs são sítios especializados de desenvolvimento de adesão pelas muitas células em cultura. Elas consistem em agregados de integrinas que transpõem a membrana plasmática, interagindo com componentes da MEC de fora da célula e com filamentos de actina de dentro das células. Muitas dessas proteínas têm sido identificadas nas FAs. Algumas são proteínas estruturais

apenas e outras estão envolvidas em transdução de sinais. A maioria de integrinas envolvidas na formação de adesão focal são membros das famílias  $\beta_1$  e  $\beta_3$ . O tipo de integrinas encontrada nas adesões focais são normalmente ditadas pelas MEC na qual as células estão aderidas (BURRIDGE, 1996). Dois conjuntos de eventos de sinalização mediados por integrinas atraíram uma grande atenção recentemente, a primeira é a ativação de FAK (focal adhesion kinase), enquanto a segunda é a ativação da cascata de MAPK (mitogen-activated protein kinase).

A FAK e suas proteínas associadas tem um papel importante na modificação do citoesqueleto e mobilidade celular, e podem ser um importante mediador de sobrevivência celular. FAK, Src, e outras proteínas adaptadoras p130<sup>CAS</sup> e paxilina formam uma sinalização quaternária distinta e unidade estrutural de sitio de adesão celular cuja reunião é normalmente iniciada pela autofosforilação da FAK.

A ativação de elementos da cascata das MAPK ocorre pelo agrupamento de integrinas. Entretanto, o mecanismo de ativação da MAPK mediado por integrina é incerto. Em um dos modelos, FAK substituiria o fator de crescimento RTK e então a via prosseguiria da FAK, até o domínio SH2 da proteína adaptadora chegando à cascata quinase “downstream” de Raf-1, MEK e MAPK. Entretanto, em todos os modelos de ativação da cascata de MAPK incluem Ras como um ponto de ligação entre integrinas e MAPK. Mais importante que o detalhamento do mecanismo da via de sinalização integrina-MAPK é a consideração de sua significância biológica. Em diversos graus, as integrinas disparam um conjunto de eventos “downstream” (ativação de Raf-1, MEK, MAPK). Deste modo, a adesão mediada por integrinas e a cascata de MAPK podem agir localmente regulando a adesão celular durante a migração celular e remodelamento tecidual (HOWE, 1998).

Ancoragem celular mediado por integrinas é conhecida como regulador de um conjunto de eventos de impacto de vias de morte celular programada. Evidências sugerem a

possibilidade de existência de dois diferentes caminhos controlados pela ancoragem. O primeiro envolve integrinas, FAK, PI 3-K (phosphoinositide 3-OH kinase) e Akt, o segundo envolve integrinas, Bcl-2, caspases e MEKK-1 (HOWE, 1998).

### ***1.8 Interação Integrinas-Doenças-Desintegrinas***

A eficiência das drogas quimioterapêuticas é limitada pela baixa sensibilidade pelas células tumorais e alta toxicidade a tecidos saudáveis. A atividade da maioria dos agentes quimioterapêuticos é mais limitada pelo desenvolvimento de resistência à droga (BROOKS, 1996; CHEN, 2004).

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, é um processo altamente regulado que participa de papel crítico em uma variedade de eventos fisiológicos normais. Esses eventos normais são o desenvolvimento, cicatrização, inflamação. Entretanto, neovascularização descontrolada pode contribuir para inúmeros processos patológicos como artrite reumatoide, diabetes, crescimento tumoral e metástase.(BROOKS, 1996; KANG, 2000; YEH, 2001, CHEN, 2004, TREMBLAY, 2005).

A angiogênese requer a cooperação de uma variedade de moléculas que regulam processos celulares como remodelamento da matriz extracelular (MEC), invasão, migração e proliferação.

A angiogênese pode ser organizada em três estágios generalizados incluindo a fase de iniciação, fase proliferativa/invasiva e a fase de diferenciação/maturação (BROOKS, 1996; STRÖMBLAD, 1996). A fase de iniciação da angiogênese pode ser acompanhada pela ativação de células endoteliais vasculares por uma variedade de citocinas angiogênicas e



outros mediadores fisiológicos (bFGF, VEGF, TNF- $\alpha$ , PDEC GF) (BROOKS, 1996). Essa ativação de células endoteliais degrada a membrana basal dessas células e a matriz extracelular ao redor permitindo a migração através de tecidos e proliferação (HONG, 2002, TREMBLAY, 2005).

Estudos têm sugerido que o comportamento invasivo das células não depende apenas de mecanismos de adesão celular. Mas requer cooperação funcional entre moléculas adesivas e enzimas proteolíticas. Uma variedade de proteases que degradam a matriz tem sugerido contribuir para o comportamento invasivo de surgimento de novos vasos sanguíneos, como membros de metaloproteinases de matriz e família de serino proteases (BROOKS, 1996).

A integrina  $\alpha\beta 3$  é um receptor promiscuo que pode se ligar a diversas proteínas da MEC, entre elas a vitronectina, fibrinogênio, fibronectina. Estudos recentes mostram que a integrina  $\alpha\beta 3$  pode também ligar-se diretamente a MMP-2. Através disso, a degradação da matriz mediada pela MMP-2 capacita um sítio de invasão/migração de células vasculares durante a angiogênese. Estas observações mostram como integrinas e proteases de maneira coordenada promovem a invasão celular durante a angiogênese (STRÖMBLAD, 1996).

Durante a angiogênese, remodelamento dinâmico da MEC, envolvendo ambas degradação matriz e deposição de novos componentes da MEC em ambiente extracelular, acontece para facilitar as diferentes fases da angiogênese.

Já a inibição da angiogênese tem mostrado prevenir o crescimento tumoral e até causar regressão tumoral em vários modelos experimentais (CHEN, 2004). A mudança no fenótipo angiogênico em tumores pode ser devido à mudança do balanço entre moduladores positivos e negativos envolvidos na neovascularização (KANG, 2000; YEH, 2001).

Em contraste aos tradicionais quimioterápicos, que o alvo são todas as células, terapia anti - angiogênica seletivamente alvo são células endoteliais ativadas e células tumorais.

A expressão de moléculas de adesão , integrinas  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$  em células capilares nascentes e suas interações com ligantes de matriz extracelulares participam da angiogênese e metástase (CHEN, 2004). A expressão de integrina  $\alpha v\beta 3$  é baixa na maioria de tecidos saudáveis, mas é marcadamente aumentada em capilares nascentes durante angiogênese em alguns tecidos (CHAIKIN, 2005). A integrina  $\alpha_v$  é torna assim um potencial alvo para estratégias anti - angiogênica. A inibição da atividade da integrina  $\alpha v$  por anticorpos monoclonais, peptídeos cíclicos RGD, e peptídeos miméticos tem sido efetiva na indução de apoptose de células endoteliais, inibição da angiogênese e no aumento da permeabilidade da monocamada endotelial em modelos animais (CHEN, 2004).

Duas vias de angiogênese dependente de citocinas foi identificadas em células vasculares,  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  que tornam-se expressas em células vasculares angiogênicas, nas quais elas participam de importante papel na angiogênese induzida por bFGF, TNF- $\alpha$ , VEGF. A ativação da integrinas  $\alpha_v\beta_3$  estimula sinais de sobrevivência que facilitam o crescimento de vasos e diferenciação, que indicam que eventos de sinalização (KANG, 2000;YEH, 2001, HONG, 2002). Isto vem a sugerir que há, no mínimo, dois caminhos distintos permitindo a angiogênese que pode em partes ser definida pela sua dependência da integrina  $\alpha v$  em particular (BROOKS, 1996).

Estes dados motivam a busca de peptídeos inibitórios da integrina  $\alpha v\beta 3$  que possam ser administrados preferencialmente através de via oral para o tratamento de câncer e outras doenças onde angiogênese contribue para a patogenicidade. Em adição a expressão vascular, integrinas  $\alpha v\beta 3$  são expressas em osteoclastos e são requeridas para a ótima reabsorção de ossos. Por essa razão, inibidores de  $\alpha v\beta 3$  tem sido procurado para o tratamento

de osteoporose. A função da  $\alpha_v\beta_3$  é mediada, em partes, pelas interações com RGD exposto nas superfícies de diversas proteínas de matriz extracelular incluindo vitronectina (CHAIKIN, 2005).

Estruturas cristalográficas de Raio-X de segmentos extracelulares da integrina  $\alpha_v\beta_3$  e seu complexo com peptídeo cíclico RGD revelou interações eletrostáticas entre peptídeo ligantes e a integrina  $\alpha_v\beta_3$ . A arginina interage com dois ânions do resíduo de aspartato na subunidade  $\alpha$ , e o ácido aspártico interage com sítio de adesão metal-íon dependente em metal cátion divalente na região da subunidade  $\beta$ . A glicina forma contatos próximo com a proteína (CHEN, 2004).

A estratégia angiostática é agora a via mais promissora para inibição de doenças angiogênese dependente, embora algumas poucas drogas tenham já sido aprovadas para aplicação clínica (Avastin, um anticorpo monoclonal anti-VEGF). Diversos modelos angiogênicos tem sido desenvolvidos para investigar mecanismos na angiogênese e permitir a identificação do melhor alvo de drogas angiogênicas em passo pré-clínico (TREMBLAY, 2005).

A integrina  $\alpha_v\beta_3$  na forma ativa foi encontrada apenas em endotélio angiogênico, fazendo dessa integrina um conveniente alvo para a terapia anti-angiogênica (GOLUBKOV, 2003).

De fato, bloqueio da integrina  $\alpha_v\beta_3$  com anticorpos específicos, peptídeos RGD ou desintegrinas contendo a sequência RGD, tem um efeito inibitório na adesão endotelial, mobilidade, invasão e formação do tubo, e esse tratamento também bloqueia a habilidade das células endoteliais serem ativadas por fatores angiogênicos de crescimento (GOLUBKOV, 2003).

A echistatina é bem conhecida por inibir a adesão, migração e sobrevivência de células endoteliais de veia de cordão umbilical. Este efeito é induzido pela sua ligação as

integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , duas integrinas que participam juntas em diferentes processos angiogênico como proliferação, migração e sobrevivência, em células endoteliais (TREMBLAY, 2005).

Agregação plaquetária tem um papel chave na hemostase. A ligação da desintegrina RGD a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  de plaquetas bloqueia a última fase da agregação plaquetária e formação de coágulo (HONG, 2002; RAMOS, 2006).

Em adição ao seu potencial de atividade anti-plaquetária, desintegrinas, peptídeos RGD sintéticos e anticorpos monoclonais anti- $\alpha_v\beta_3$  revelam novos usos em diagnósticos de doenças cardiovasculares e o desenho de agentes terapêuticos na trombose arterial, osteoporose e angiogênese relacionada a crescimento tumoral e metástase (KANG, 2000, HONG, 2002; YEH, 2001).

Moléculas de desintegrinas podem ser exploradas em terapia contra diversas patologias incluindo Alzheimer, inflamação, doenças autoimunes, infecção por vírus, osteoporose, trombose e câncer (CALVETE, 2005). Essas toxinas tem sido investigadas no desenvolvimento farmacêutico. Echistatina e kistrina foram os protótipos de medicamentos já em uso em doenças como trombose e outras doenças cardiovasculares (Aggrastat). Peptídeos que mimetizam RGD estão em desenvolvimento para tratamento de câncer pela inibição da metástase tumoral e da angiogênese (RAMOS, 2006).

A complexa mistura de componentes presentes nos venenos de serpentes não apenas está trazendo conhecimentos sobre habitat, localização geográfica, dieta desses animais, mas também está sendo uma fonte rica de elementos que estão sendo estudados para diversos fins. A utilidade desses componentes está no campo da farmacologia com o desenvolvimento de modelos, protótipos de medicamentos, para diversas terapias em doenças humanas. Além disso, tem aumentado a compreensão de vários processos fisiológicos. Dentre esses componentes do veneno de serpentes, as desintegrinas tem chamado atenção. Elas têm

demonstrado participar de importantes processos, normais e patológicos, nos quais as integrinas, seus ligantes, desempenham papel de fundamental importância. No entanto, além da eminente extinção desses animais em razão da ameaça que eles representam para os humanos, as desintegrinas presentes nos venenos de serpentes encontram-se em pequenas proporções. Métodos demorados são necessários para o isolamento destas proteínas no veneno bruto. Deste modo, a expressão heteróloga funcional de desintegrinas pode providenciar quantidades suficientes de material para estudos farmacológicos (ZHOU, 2000) e evita aumentar a pressão de extinção sobre as serpentes. Estas proteínas obtidas através desse sistema podem ser usadas para a compreensão dos mecanismos de ação visando seu potencial de uso clínico e assim o desenvolvimento de um modo de obtenção interessante para as indústrias farmacêuticas deste composto de ação farmacológica.

O estudo de proteínas presentes no veneno de serpentes, SVMP e desintegrinas nativas e recombinantes, há tempos é fonte de estudo em nosso laboratório.

A *Agkistrodon contortrix lacticinctus* é uma das serpentes que teve uma das proteínas de seu veneno estudado em nosso laboratório. A ACLD-C é uma tipo-desintegrina obtida da forma recombinante, com o motivo adesivo DCD. Ela foi capaz de inibir a adesão da integrina  $\alpha_2\beta_1$  ao colágeno tipo I de maneira dose-dependente (IEMMA, tese de doutorado, 2002) e foi capaz de induzir a expressão de VEGF em fibroblasto (RIBEIRO, dissertação de mestrado, 2005).

Outra proteína recombinante estudada em nosso laboratório foi ACLF, SVMP classe P-I não hemorrágica e atividade fibrinolítica (SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2000). O zimogênio dessa proteína, pro-ACLF também foi estudado e produzido de forma recombinante (RAMOS, 2002).

Do veneno de *Bothrops alternatus* foi isolado a BaG, uma SVMP classe P-III, dimérica. Atividade hemorrágica, inibição da agregação plaquetária induzida por ADP, reação com anticorpo anti-echistatina sugerindo possuir o motivo RGD são algumas das suas características (COMINETTI, 2003). Ainda do veneno de *Bothrops alternatus*, uma outra SVMP classe P-III foi estudada, a alternagina. SOUZA *et al.* (2000) mostraram que essa proteína inibe a adesão de células K562 transfectada com  $\alpha_2\beta_1$  ao colágeno.

Também dessa serpente foi estudada uma desintegrina de classe P-III chamada ALT-C, produto do processamento proteolítico do domínio rico em cisteína da Alternagina (SOUZA, 2000). Esta desintegrina é capaz de promover a proliferação de células endoteliais (HUVEC) e induzir expressão de VEGF em fibroblastos humanos (COMINETTI, 2004). Essa desintegrina-símile, ECD, não é capaz de induzir a desadesão de linhagens celulares, não é citotóxica para células não tumorais e produz seus efeitos de maneira-dose dependente (TERRUGGI, tese de doutorado, 2004).

### **1.9 DISBA-01**

Uma biblioteca de cDNA em fagos  $\lambda$  foi construída com sucesso a partir de mRNAs presentes na glândula venenífera de um exemplar da espécie *Bothrops alternatus*. Nesta biblioteca foi isolado um clone que codifica uma desintegrina média (78 aminoácidos) com motivo de reconhecimento RGD, estrutura terciária mantida por seis pontes de dissulfeto internas e similaridade com outras desintegrinas tanto do gênero *Bothrops* quanto de outros gêneros como *Gloydia*, *Trimeresurus*, *Agkistrodon*.

Esta desintegrina (~12 kDa) foi obtida de modo heterólogo em corpos de inclusão em *E. coli* e denominada DisBa-01. Diversos ensaios foram realizados demonstrando que essa desintegrina recombinante foi capaz de inibir a agregação plaquetária bloqueando a integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  presente nas plaquetas e de inibir a formação de trombos e a atividade metastática de algumas linhagens tumorais (RAMOS, tese de doutorado, 2005).

No entanto esta desintegrina não está totalmente livre de contaminantes e nem totalmente caracterizada. Além disso, a DisBa-01 ainda não foi isolada do veneno bruto.

## 2.OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- ✓ Otimizar a purificação da DisBa-01, uma desintegrina RGD recombinante da serpente *Bothrops alternatus* e a produzir anticorpos policlonais contra esta desintegrina recombinante ;
- ✓ Avaliar os efeitos da DisBa-01 sobre células endoteliais (HUVEC \_ células endoteliais de veia de cordão umbilical) através de ensaios biológicos *in vitro*.



### **3.MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1MATERIAIS E EQUIPAMENTOS**

##### **3.1.1 Proteína**

A proteína DisBa-01 , desintegrina RGD recombinante de *Bothrops alternatus*, utilizada nesse trabalho foi obtida a partir de um clone presente na biblioteca de cDNA construída em nosso laboratório, a partir da glândula venenífera de um espécime da serpente *Bothrops alternatus* .

Esta biblioteca de cDNA foi triada na busca de desintegrinas através de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando diversas combinações de oligonucleotídeos iniciadores (primers) senso e anti-senso baseados em seqüências conservadas de desintegrinas de diversos gêneros de serpentes. O produto da amplificação (236 pb) foi subclonado no vetor de expressão pET 28 a (Novagen, Madison,WI, USA) de modo que esta proteína fosse expressa juntamente com um peptídeo de fusão contendo 6 histidinas na região N-terminal. Este peptídeo de fusão-01 permite a purificação da proteína de interesse através de cromatografia de afinidade. O plasmídeo recombinante foi denominado pDisBa-01 (figura 10) e a seqüência depositada no Genbank sob número de acesso AY 259516.

O sistema de produção heteróloga da proteína em cepas da linhagem BL21 (DE3) de *Escherichia coli* (Novagen, Madison, WI, USA) foi otimizada em nosso laboratório (RAMOS, Tese de doutorado 2005).

```

      pET28a fusion peptide
      |
1  |  ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC AGC GGC CTG GTG 45
1  |  M  G  S  S  H  H  H  H  H  H  S  S  G  L  V 15

46  |  CCG CGC GGC AGC CAT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG 90
16  |  P  R  G  S  H  M  A  S  M  T  G  G  Q  Q  M 30
      |
      |  DisBa-01
91  |  GGT CGC GGA TCC GGA AAT GAA CTT TTG GAG GCG GGA GAA GAA TGT 135
31  |  G  R  G  S  G  N  E  L  L  E  A  G  E  E  C 45

136  |  GAC TGT GGC ACT CCT GGA AAT CCG TGC TGC GAT GCT GCA ACC TGT 180
46  |  D  C  G  T  P  G  N  P  C  C  D  A  A  T  C 60

181  |  AAA CTG AGA CCA GGG GCG CAG TGT GCA GAA GGA CTG TGT TGT GAC 225
61  |  K  L  R  P  G  A  Q  C  A  E  G  L  C  C  D 75

226  |  CAG TGC AGA TTT ATG AAA GAA GGA ACA GTA TGC CGG ATT GCA AGG 270
76  |  Q  C  R  F  M  K  E  G  T  V  C  R  I  A  R 90

271  |  GGT GAT GAC ATG GAT GAT TAC TGC AAT GGC ATA TCT GCT GGC TGT 315
91  |  G  D  D  M  D  D  Y  C  N  G  I  S  A  G  C 105

316  |  CCC AGA AAT CCC TTC CAT GCC TAA 339
106  |  P  R  N  P  F  H  A  * 112

```

**Figura 10** Sequência traduzida da região de clonagem do vetor pET28DisBa. Em destaque o motivo RGD.

### 3.1.2 Resinas Cromatográficas

Os procedimentos de purificação da proteína recombinante foram realizados utilizando resina de níquel (Ni-NTA) (Quiagen, Valencia, CA, USA) e resina de troca iônica (aniônica) MonoQ HR 5/5 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

### 3.1.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos, machos, obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

### 3.1.4 Western Blotting (Imunodeteção)

O ensaio de expressão e a purificação foram monitorados através de *Western Blotting*, assim como a produção dos anticorpos policlonais contra a proteína de interesse utilizando-se membranas de nitrocelulose (Nitrocellulose membranes 0.2, Sigma-Aldrich,) e os anticorpos:

-Anti-His tag (Sigma)

-Anti-DisBa-01: origem policlonal obtido a partir da imunização de camundongos utilizando a DisBa-01;

-Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA).

A revelação do ensaio de imunodeteção foi feita com substrato cromogênico BCIP (bromo cloro indoil fosfato) na presença de NBT (cloreto de nitroblue tetrazólio).

### **3.1.6 Padrões Moleculares de Proteína**

Os padrões moleculares de proteínas utilizados para eletroforese SDS-PAGE e *western blotting* foram “Prestained SDS-PAGE Standards Low Range” (Biorad,USA) e padrão molecular de proteína preparados no próprio laboratório através de mistura de proteínas (Sigma) de massas moleculares conhecidas.

### **3.1.7 Diálise**

Uma membrana com tamanho de poro MWCO 3,5 kDa, menor que a proteína de interesse, foi utilizada para a diálise entre as cromatografias.

### **3.1.8 Concentração da amostra**

As amostras contendo a proteína foram concentradas no equipamento SC10A Speed Vac (Savant).

### **3.1.9 Quantificação Protéica**

A determinação da concentração de proteína foi feita utilizando-se o *kit* de detecção colorimétrica BCA (BCA Protein Assay, Pierce).

### **3.1.10 Clivagem com Trombina**

O fator de coagulação trombina (Biotinylated Thrombin, Novagen, Califórnia, USA) foi utilizado para catalisar a clivagem da proteína de interesse da proteína de fusão.

### **3.1.11 Sequenciamento de proteína**

A proteína de interesse foi aplicada diretamente em uma membrana de fibra de vidro ou eventualmente imobilizada em membrana de PVDF após resolução em gel de poliacrilamida-SDS, transferência semi-seca (Sequi-Blot PVDF Membrane for Protein Sequencing, Bio Rad, USA) e essas amostras foram analisadas pelo Sequenciador de Proteínas Automatizado da marca Shimadzu (Sistema PPSQ-21/23) presente em nosso laboratório.

### **3.1.12 Determinação de massa molecular por eletrospray – espectrometria de massas**

O espectrômetro de massas utilizado para a determinação da massa molecular da proteína foi um eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK). O espectro resultante de íons com múltiplas protonações foram desconvolvidos para massa molecular pelo programa MaxEnt1 (MassLynx v.3.3).

As análises foram realizadas no Centro de Química de Proteínas pelo Prof. Dr. José César Rosa coordenador do Centro e Depto. de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

### **3.1.13 Linhagem Celular**

Ensaio de adesão e proliferação de células HUVECs (células endoteliais de veia de cordão umbilical humano) em cultura primária, foram realizados nos laboratórios do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Verônica Maria Morandi da Silva.

### **3.1.14 Cultivo Celular**

As células HUVEC foram cultivadas em meio 199 (M-199)(Sigma) com HEPES (Sigma), suplementado com antibióticos, fungizona, l-glutamina 2mM e SFB 10% (Gibco). Ambas as culturas foram mantidas em estufa a 37°C, em presença de 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.1.15 Outros Reagentes**

Todos os demais reagentes utilizados neste trabalho possuíam grau de pureza analítico.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Ensaio de Expressão e Solubilidade**

Culturas de *Escherichia coli* BL21(DE3) pDisBa-01 foram crescidas em meio LB (Luria Bertani) (Sigma, USA) seletivo com canamicina (30µg/ml) a 37°C e agitação de

250 rpm durante 16 horas. Após esse período, essa cultura foi diluída 1:25(v/v) em LB contendo canamicina (30 $\mu$ g/ml) (Sigma, USA) e incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm até alcançar uma D.O<sub>660nm</sub> entre 0.4-0.6. Neste momento, foi retirada uma amostra T0 (Tempo anterior a indução) de 1ml para a verificação da expressão protéica basal. Esta amostra T0 foi centrifugada a 13000 rpm durante 1 minuto e ressuspensa em água estéril e tampão de amostra (2:1) (Tris-HCl 125mM, pH 6.8, SDS (dodecil-sulfato de sódio) 4% (m/v), glicerol 20%, 0,02% de azul de bromofenol (m/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1M) para SDS-PAGE.

O restante da cultura em fase logarítmica de crescimento teve a expressão induzida pela adição de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo), um indutor artificial do promotor Lac presente no vetor de expressão pET 28a. na concentração final igual a 0,5mM durante 3 horas sob agitação de 250 rpm a 37°C. Após três horas de indução, uma amostra de 1ml denominada T3 (Tempo de três horas de indução) foi retirada e passou pelo mesmo procedimento da amostra T0. O restante da cultura foi centrifugado por 5 minutos a 5000X g e 4°C (Sorvall RC 5C Plus), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão de ligação (Tris-HCl 40mM, NaCl 0,5M, Imidazol 5,0mM) . As células foram incubadas durante 30 minutos no tampão de ligação e passado esse tempo elas foram lisadas através de sonicação (6 pulsos de 1 minuto cada com amplitude de 20).

A cultura de células lisadas foi centrifugada (15 minutos, 13000X g, 4°C). Uma amostra do sobrenadante obtido (S1) foi retirada e acrescida de tampão de amostra. O precipitado foi resolubilizado em tampão de ligação desnaturante (acrescido de Uréia 6M) e passou por mais uma sessão de sonicação para a lise final das células bacterianas. Após a incubação de 1 hora a 4°C, o precipitado solubilizado foi novamente centrifugado a 13000 rpm, 15 minutos, 4°C. Uma outra amostra foi retirada do novo sobrenadante (S2) e a ela foi adicionado tampão de amostra. O restante do sobrenadante (S2) foi filtrado em papel filtro e guardado a 4°C.



As amostras retiradas durante todo o processo de expressão e solubilização da DisBa-01 (T0, T3, S1, S2) foram fervidas durante 5 minutos, posteriormente T0 e T3 foram centrifugadas a 13000 rpm durante 2 minutos e todas as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) e submetidas à reação de imunodeteção por *Western Blotting*.

### **3.2.2 Eletroforese em SDS-PAGE**

A expressão, a purificação e clivagem da DisBa-01 com trombina foram acompanhadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970). As amostras foram aplicadas em um gel de empilhamento de 5% de poliacrilamida e o gel de resolução apresentava 15% de poliacrilamida. Às amostras foi adicionado o tampão desnaturante contendo  $\beta$ -mercaptoetanol e azul de Comassie Blue R 250. Essas amostras foram submetidas à eletroforese com uma corrente elétrica de 25mA e 110V, por aproximadamente uma hora e meia.

As amostras foram preparadas com tampão de amostra (Tris-HCl 125mM pH 6,8, SDS 4%, 0,025% azul de bromofenol, glicerol 20%, 0,1M  $\beta$ -mercaptoetanol) na proporção de 1 de tampão de amostra : 2 de amostra e fervidas durante 5 minutos a 100°C.

As bandas protéicas foram reveladas incubando os géis de poliacrilamida em solução corante de 0,25%(v/v) de *Comassie Blue* R-250 (Sigma, USA) dissolvido em 50% (v/v) de isopropanol e 10% (v/v) de ácido acético durante 30 minutos e depois na solução descorante de 10% (v/v) de ácido acético e 10%(v/v) de metanol.

A massa molecular da *DisBa-01* foi estimada utilizando padrões de massa molecular conhecidos entre 12 e 66 kDa (produzidos no nosso laboratório).

### ***3.2.3 Purificação da DisBa-01***

Após análise da expressão e solubilização da *DisBa-01* através de SDS-PAGE, a proteína recombinante passou pelo processo de purificação.

### **3.2.4 Cromatografia de Afinidade**

A proteína de interesse solubilizada em tampão de ligação desnaturante (S2) foi fracionada sob condições desnaturantes por cromatografia de afinidade em coluna de 5 ml de resina de Níquel-NTA sob o fluxo constante de 1ml/min.

A coluna foi previamente equilibrada com quatro volumes de tampão de ligação desnaturante (Tampão de ligação com 6M de Uréia e 20mM de Imidazol). A amostra foi então aplicada na coluna de níquel contendo a proteína recombinante. Em seguida a coluna foi lavada com 4 volumes do mesmo tampão de ligação desnaturante do equilíbrio da coluna, posterior a esse tampão, um gradiente de Imidazol foi aplicado na coluna de níquel para a eluição das proteínas ligadas a resina e em especial a proteína de interesse.

As frações foram coletadas com o auxílio de um coletor automático (Pharmacia), configurado para um tempo de coleta de frações de três minutos (3ml/fração). Aliquotas de cada fração foram analisadas em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.

### **3.2.5 Diálise**

As frações eluídas da coluna de níquel com a *DisBa-01* foram reunidas e colocadas numa membrana de diálise com poro do tamanho de 3,5 kDa, que permite a passagem de solutos pequenos. Essas frações foram dialisadas contra solução 3M de uréia em água durante 1 hora para a redução da pressão osmótica e posteriormente outras 3 vezes contra água ultrapura por 1 hora cada para a retirada por completo da uréia da solução de proteína e assim proceder ao outro passo cromatográfico.

Após a diálise, a amostra sem o agente desnaturante foi concentrada (SC210A Speed Vac) para um volume final de 1 ml e equilibrada em tampão A (Tris-HCl 20 mM pH 8.6) para o próximo passo cromatográfico.

### 3.2.6 Cromatografia de Troca Iônica

As frações contendo a proteína de interesse obtida da cromatografia de afinidade, dialisadas e concentradas para um volume final de 1 ml foram submetidas a uma cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ HR 5/5 (Amersham Pharmacia Biotech) sob um fluxo de 1ml/min no sistema de alta pressão Äkta Design (Amersham Biosciences.UPC-900). Esta cromatografia foi realizada utilizando como fase móvel inicial o tampão A (Tris-HCl 20mM pH 8.6) e posteriormente foi estabelecido um gradiente de NaCl (de 0-1M) através da mistura do tampão B (Tris-HCl 20mM, Na Cl 1 M pH 8.6).

As frações dos vários picos obtidos foram analisadas por SDS-PAGE e submetidas a ensaio de imunodeteção por *dot blot* e/ou *Western blotting*. As frações com a DisBa-01 foram reunidas e dialisadas contra água (3 vezes por 30 minutos) e finalmente contra o tampão (1 vez por 30 minutos) no qual a proteína seria usada para ensaios biológicos.

### 3.2.7 Ensaio de Imunodeteção (Western Blotting/Dot Blot)

A expressão e a purificação da DisBa-01 foram monitoradas pelo ensaio de imunodeteção tanto por *Western Blotting* com anticorpos anti-histag (1:5000), quanto por *dot-blot*.

As amostras foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 15% e, em seguida transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Sigma-Aldrich), através do sistema de transferência semi-seca (*TransBlot SemiDry*) (BioRad), usando tampão de transferência Tris-

HCl 48mM, glicina 39mM, metanol 20% pH 9,0 durante 30 minutos a 20V. Para confirmar a eficiência da transferência, o gel de poliacrilamida foi corado com 0,25% de *Comassie Blue* R-250 (Sigma) dissolvido em 50% de isopropanol e 10% de ácido acético e a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau 0,5% (m/v) em ácido acético 0,1% (v/v). As bandas referentes a proteína de interesse foram marcadas e a membrana descorada com ácido acético 0,1% (v/v) e o gel de poliacrilamida com 10% de ácido acético e 10% de metanol .

Para o *dot blot* as amostras (100µl) referentes às frações da cromatografia de troca iônica foram fixadas na membrana de nitrocelulose através do sistema *dot blot* (Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus, Bio Rad) com a ajuda de uma bomba de vácuo ( BioRad).

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (leite desnatado 5%, Tween 20 0,5% em TBS 1X) durante 16 horas. Após esse período, a membrana foi lavada com TBS 4 vezes durante 3 minutos e incubada por 3 horas com o anticorpo anti-histag (1:5000).

Terminada a segunda lavagem, a membrana foi incubada com solução contendo o substrato cromogênico, BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indoilo-fosfato de p-toluidina) na presença de NBT (cloreto de nitroblue tetrazólio). A revelação foi interrompida por lavagem da membrana com água.

### 3.2.8 Dosagem de Proteínas

A concentração de proteína foi realizada através do kit *BCA™ Protein Assay Kit*. Este kit é uma formulação baseada no método do ácido bicinrônico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação de proteína total (Smith *et al.*, 1985). Uma série de

diluições de soroalbumina bovina (BSA) de concentração conhecida (25µg/ml a 2.000µg/ml) foi preparada e testada juntamente com as amostras de concentração desconhecida, de acordo com as instruções do fabricante. A reação produzida por este método exibe uma forte absorvância em 562nm que é aproximadamente linear com as concentrações protéicas crescentes em um intervalo de 20 a 2.000µg/ml. Desta forma, após a leitura da absorvância de todas as reações, a concentração protéica das amostras purificadas foi determinada a partir da curva padrão construída através das diluições de BSA.

### **3.2.9 Clivagem com Trombina**

Após passar pelo processo de purificação, o peptídeo de fusão contendo as seis histidinas foi retirado por clivagem com trombina. Esta serino protease reconhece a seqüência Leu Val Pro Arg Gly Ser (marcada em vermelho na figura) entre a cauda de histidinas e a seqüência inserida no sítio múltiplo de clonagem entre os sítios de restrição BamHI e Eco RI (figura 11).

A proteína de estudo foi dialisada durante 1 hora em PBS a 4°C. Em seguida, foram incubados 600 µg da proteína na presença de 1350U de trombina (Novagen) durante 16 horas a 22°C. A clivagem da proteína foi então verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida.



**Figura 11** Mapa parcial do vetor pET-28 a com seqüência reconhecida pela Trombina em vermelho.

### 3.2.10 Sequenciamento de Aminoácidos

A seqüência primária do N-terminal da proteína *DisBa-01* foi obtida pelo sequenciamento protéico através do método de degradação de Edman.

A proteína após os procedimentos de purificação foi aplicada em solução numa membrana de fibra de vidro (Wako, Japão) na concentração de final de 300 pmol. A partir daí o seqüenciador automático Shimadzu (PPSQ-20) procedeu à análise da estrutura primária da proteína de interesse.

### 3.2.11 Espectrometria de Massa

A amostra foi dessalinizada em resina POROS R2 montada em um microtip, ativada com metanol, equilibrada com 0.2% ácido fórmico e eluída em 30ul de 0,2% de ácido fórmico em 50% de acetronitrila.

O espectrômetro de massas utilizado para a determinação de massa molecular da proteína foi um eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) sendo a amostra infundida por uma bomba tipo seringa (Harvard) com fluxo de 0.3ml/h em uma fonte de ionização tipo nanofluxo com capilar de sílica de 50µm submetida a 3.5volts, 40 volts no cone e temperatura de 100°C. Os espectros de massa em MS1 foram coletados durante 2 minutos com 2.75 seg/scan (acumulado de 43 scans). O espectro resultante de íons com múltiplas protonação foram desconvoluídos para massa molecular pelo programa MaxEnt1 (MassLynx v.3.3).

### 3.2.12 Imunização dos Camundongos

A produção de anticorpos policlonais foi realizada utilizando camundongos, fêmeas e machos de aproximadamente 1 mês de vida.

A proteína de estudo, na concentração de 50 µg foi emulsionada com uma solução de mesmo volume com adjuvante de Freund's completo (Sigma). Esta emulsão de



antígeno com o adjuvante de Freund's foi injetada intradermicamente no dorso dos animais. Após 45 dias aproximadamente, uma segunda inoculação agora de 10 µg do antígeno (DisBa-01) foi realizada. Desta vez, a inoculação foi intraperitoneal sem adjuvante e, passados 10 dias desta segunda injeção, os camundongos foram sacrificados e o sangue coletado.

### 3.2.13 Titulação dos Anticorpos Policlonais

O sangue coletado após o sacrifício dos animais foi deixado em temperatura ambiente para que coagulasse e houvesse uma separação entre a parte celular e soro do sangue. O sangue foi então centrifugado em baixa rotação (Centrifuge 5804R) e o sobrenadante (soro) foi coletado e armazenado para a titulação. O soro armazenado foi diluído em TBS T em diversas proporções para que o título desses anticorpos fosse encontrado.

As diluições dos anticorpos testados foram: 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000 e 1:32000. Os testes desses anticorpos foram feitos através de *Dot Blot*, uma transferência direta a vácuo para membrana de nitrocelulose, com uma massa única de proteína (5µg) sendo o que variou foi apenas a diluição dos anticorpos. A membrana com a proteína fixada foi mantida durante 16 horas em solução bloqueio feita com leite em pó e tampão TBS (Tris Buffered Saline). Depois desse período, a membrana foi lavada três vezes com TBS durante 3 minutos cada lavagem e depois durante 2 horas, cada membrana referente a cada título de anticorpo analisado foi deixada em contato com os anticorpos. A membrana foi então lavada novamente com TBS três vezes, três minutos cada lavagem e incubada com o segundo anticorpo, anti-IgG camundongo conjugado com fosfatase alcalina com título de

1:5000 durante 2 horas. Novamente, passado esse tempo de incubação com os anticorpos, as membranas de nitrocelulose foram lavadas com TBST e reveladas com NBT e BCIP.

Os anticorpos também foram titulados por ELISA. Em placa de 96 poços (Corning), 5 ug da proteína de estudo, *DisBa-01*, em 100ul /poço em solução de carbonato de sódio 50mM pH 9.6 foi deixada durante 12 horas a 4°C. Passado esse tempo, os poços foram lavados 4 vezes com PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X. Em seguida, 100ul/poço de BSA dissolvidos em PBS foram adicionados e deixados no poço por 12 horas a 4°C. No dia seguinte, essa solução foi retirada dos poços, eles foram então lavados 4 vezes com PBS e incubados com cada título do anticorpo anti-*DisBa-01* durante 1 hora a 37°C em estufa. Passado esse tempo, os anticorpos foram retirados dos poços, estes foram lavados com TBS T (TBS Tween 20) e incubados por 2 horas a 37°C com anti-IgG de camundongos. Depois desse tempo, a placa foi retirada da estufa, os anticorpos secundários retirados dos poços, esses foram lavados com TBS T 4 vezes e aos poços foi adicionada uma solução preparada 30 minutos antes de alcalina fosfatase para ELISA. A placa foi incubada durante 1 hora no escuro e lida em a 520 nm em leitor de ELISA Dynex.

### **3.2.14 Documentação de Imagens**

As imagens referentes aos géis de poliacrilamida e às membranas de imunodeteção presentes nesse trabalho foram documentadas com a ajuda do escaner (ScanJet Hewlet Packard) e da câmara Kodak DS 120.

### 3.2.15 Ensaios Celulares

### 3.2.16 Ensaios de adesão

#### 1 Promoção de adesão

Para o ensaio de promoção da adesão celular, a proteína a ser testada em diversas concentrações (1nM - 1.000nM), em meio sem soro, foi imobilizada em placa de 96 poços (100µl/poço), e irradiada por luz UV durante 30 minutos. BSA 0,05% foi adicionada aos poços do controle negativo. A placa foi então incubada a 4°C *overnight*. Os poços foram bloqueados com BSA 0,05% em tampão PBS pH 7.4 (300µl/poço) por 3-4horas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o bloqueio, os poços foram lavados com tampão PBS pH 7.4 e foram adicionadas 3x10<sup>4</sup> células (HUVEC) em meio sem soro/poço, incubando-se novamente a placa em estufa por 2horas. O meio de cultura foi aspirado, os poços foram lavados com PBS e adicionaram-se 50µl/poço de solução de MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue – SIGMA) para concentração final de 0,5mg/ml. As placas foram novamente incubadas por 4 horas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. O precipitado formado foi então solubilizado com isopropanol e a leitura da placa foi feita em leitor de ELISA a uma absorbância de 595nm.

Paralelamente, uma curva padrão foi preparada usando concentrações conhecidas de células em 200 µl meio com 10% de soro (1x10<sup>3</sup>, 5x10<sup>3</sup>, 1x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>4</sup>, 3x10<sup>4</sup>,

$4 \times 10^4$  células/poço). As células foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  por 2 horas. A adição de MTT, a incubação da placa e sua leitura foram realizadas como descrito acima.

## **2. Adesão celular para controle da proliferação**

Para analisar a influência da *DisBa-01* na proliferação das células endoteliais com a proteína imobilizada nos poços, foram realizados ensaios de promoção da adesão para controle da proliferação, a fim de correlacionar a proliferação com o número de células que aderem no suporte, no caso *DisBa-01*. Desta forma, o número de células que proliferaram será considerado a partir do número de células adicionadas em cada poço que aderiram ao suporte.

Tal ensaio de adesão controle foi realizado da mesma forma que o ensaio de promoção descrito acima, porém com o mesmo número de células utilizado no ensaio de proliferação ( $5 \times 10^3$  células/poço) e meio com soro.

### **3.1 Ensaios de proliferação proteína imobilizada**

Para o ensaio de proliferação celular com *DisBa-01* imobilizada nos poços, a desintegrina em diversas concentrações (1nM, 10nM, 100nM e 1.000nM) foi imobilizada em

placa de 96 poços (100 µl/poço), irradiada por luz UV durante 30 minutos. BSA 0,05% foi adicionado aos poços do controle negativo. A placa foi incubada a 4°C *overnight*. Os poços que continham DisBa-01 foram bloqueados com BSA 0,05% (300 µl/poço) por 3-4 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o bloqueio, os poços foram lavados com tampão PBS pH 7.4 e foram adicionadas 5x10<sup>3</sup> células em 100µl de meio M-199 com 10% soro/poço para as HUVEC , incubando-se a placa em estufa por 72 horas. O meio de cultura foi aspirado, os poços foram lavados com PBS e adicionaram-se 50µl/poço de solução de MTT para concentração final de 0,5mg/ml e as placas foram novamente incubadas por 4 horas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O precipitado formado foi então solubilizado com isopropanol e a leitura da placa foi feita em leitor de ELISA (595nm).

Uma curva padrão também foi feita para esse experimento, como já citado anteriormente.

### **3.2 Ensaios de proliferação proteína solúvel**

Para o ensaio de proliferação celular com DisBa-01 solúvel nos poços, os poços foram preenchidos com gelatina (100ul/poço), irradiada por luz UV durante 30 minutos. A placa foi incubada a 4°C *overnigh*. Os poços foram lavados com tampão PBS pH 7.4 e foram adicionadas 5x10<sup>3</sup> células (HMEC-I) em 100µl de meio MCDB-131, com 10% soro/poço durante 2 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Passado esse tempo, a desintegrina em diversas concentrações (1nM, 10nM, 100nM e 1.000nM) foi adicionada à placa de 96 poços (100 µl/poço), e a placa foi incubada em estufa por 72h.

O meio de cultura foi aspirado, os poços foram lavados com PBS e adicionaram-se 50µl/poço de solução de MTT para concentração final de 0,5mg/ml e as placas foram novamente incubadas por 4 horas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O precipitado formado foi então solubilizado com isopropanol e a leitura da placa foi feita em leitor de ELISA (595nm).

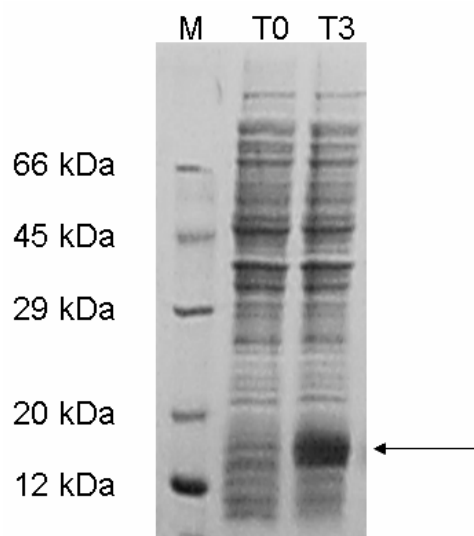
Uma curva padrão também foi feita para esse experimento, como já citado anteriormente.

Tanto os experimentos de adesão como os experimentos de proliferação foram realizados no mínimo em triplicata.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ensaio de Expressão e Solubilidade

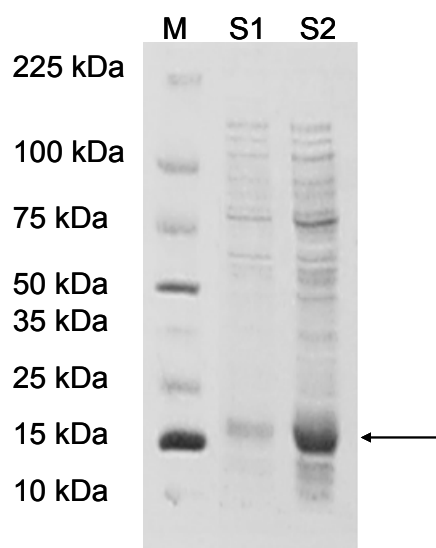
Para a análise da produção da proteína DisBa-01, culturas de *E.coli* B1 21(DE3) pET28aDisBa, foram crescidas em meio seletivo com canamicina e alíquotas T0, T3 foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE (15%).(figura 12). Foi possível verificar no tempo após a indução com IPTG (T3), uma super produção da proteína na altura aproximada de 12 kDa se comparado com o tempo inicial, tempo anterior a indução da cultura, referente a expressão basal de proteína da bactéria (figura 12).



**Figura 12** Análise de Expressão da DisBa-01 em *E.coli* (B121(DE3)) por (SDS-PAGE 15%)

M: Marcador Molecular; T0: extrato bacteriano obtido antes (T0) e depois (T3) de 3 horas da indução com IPTG. A seta indica a banda de expressão da DisBa-01.

O ensaio de solubilidade, também analisado em SDS-PAGE (15%), permitiu a observação da presença da proteína em corpos de inclusão, porém a proteína de interesse foi recuperada com a ajuda de agentes desnaturantes (caotrópicos) e ondas de ultra-som. Esta solubilização foi verificada analisando a ausência da proteína no sobrenadante 1 (S1) e na liberação da proteína de interesse no S2 (figura 13).



**Figura 13** Ensaio de Solubilidade da *DisBa-01* (SDS-PAGE 15%).  
M: marcador de massa molecular (Promega); S1: sobrenadante não desnaturante; S2: sobrenadante desnaturante (6M Uréia); Seta indica banda da proteína de interesse.

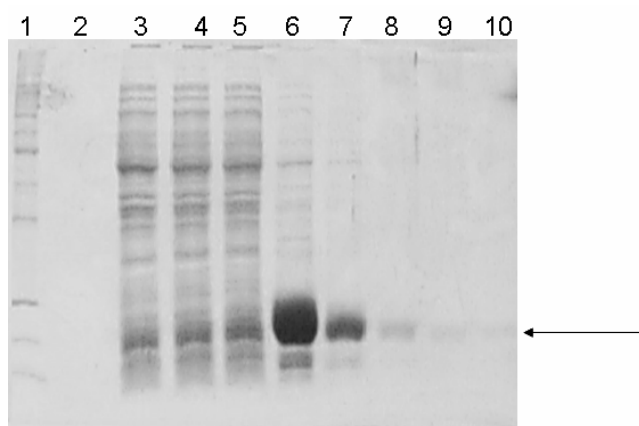


## 4.2 Purificação da Proteína Recombinante

### 4.2.1 Cromatografia de Afinidade

O sobrenadante desnaturante (S2) contendo a proteína de interesse foi filtrado em papel filtro para a retirada de restos de células bacterianas de *E.coli*. Em coluna de resina de Níquel em condições desnaturantes a amostra protéica foi fracionada devido ao fato da proteína de interesse ser expressa com um peptídeo de fusão N-terminal, contendo seis resíduos consecutivos de histidinas e esses resíduos apresentarem afinidade por íons de Níquel.

A eluição da proteína de interesse foi realizada utilizando um gradiente manual de Imidazol (20mM-1M) e foram analisadas por SDS-PAGE (15%) (figura 14) e western blotting.



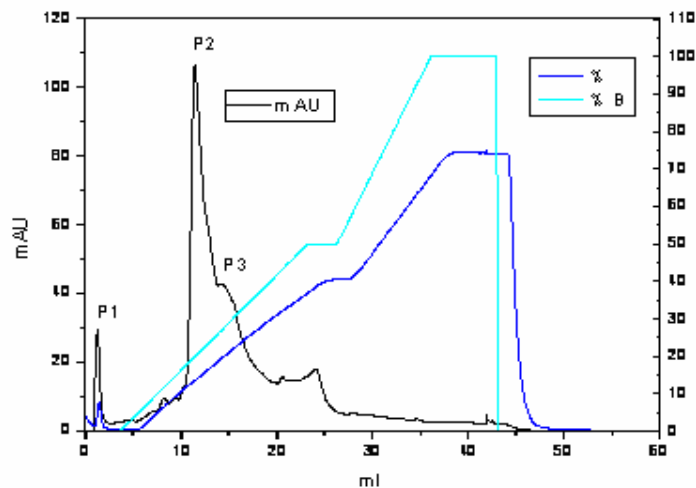
**Figura 14** SDS-PAGE das amostras da cromatografia de afinidade. Análise em SDS-PAGE 15% das amostras eluídas da coluna de Níquel a partir do S2. 1: Padrão de massa molecular; 2: Amostra aplicada na coluna (S2); 3-5: amostras eluídas com tampão de ligação (5 mM Imidazol); 6-10: Amostras eluídas com gradiente de Imidazol (20 mM – 100 mM); Seta indica a banda da proteína de interesse.

Na figura 14 é possível verificar que a proteína de interesse não é obtida pura após a sua eluição com o gradiente de Imidazol na coluna de resina de níquel mas a maioria dos contaminantes é eluído antes da DisBa-01 com uma porcentagem menor de Imidazol.

A confirmação de que na purificação parcial da DisBa-01 a proteína que estava sendo purificada se tratava realmente de uma proteína recombinante foi realizada através de imunodeteção com anticorpo anti-histag (figura 18).

#### 4.2.2 Cromatografia de Troca-Íônica

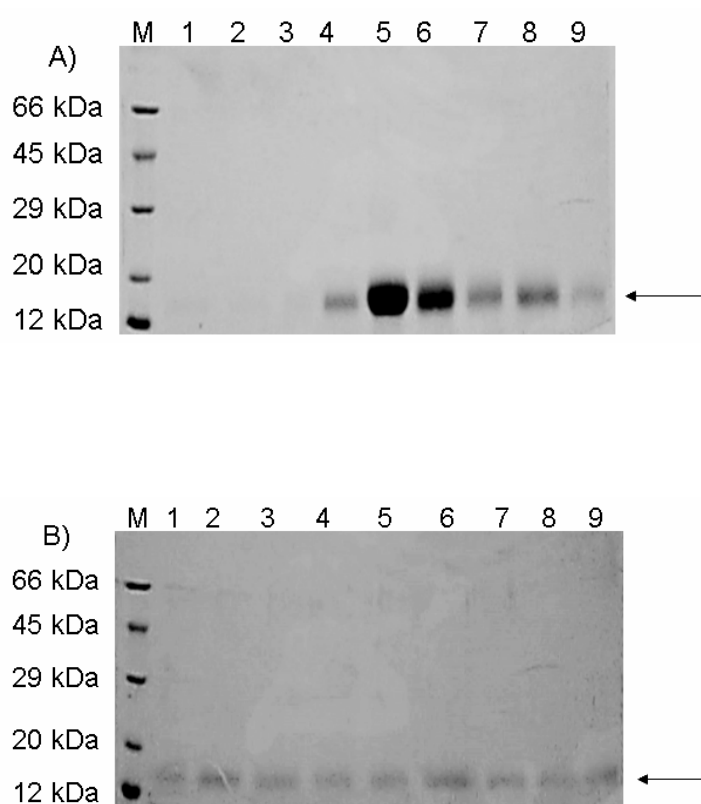
As frações eluídas da coluna de afinidade contendo a proteína de interesse foram dialisadas e concentradas para um volume final de aproximadamente 1 mL. Esta amostra foi submetida a um novo fracionamento em coluna de troca-iônica. Na figura 15 está representado o perfil cromatográfico da purificação da DisBa-01 (curva azul) assim como o perfil do gradiente de NaCl (0nM-100nM) usado na eluição da proteína de interesse (curva marrom).



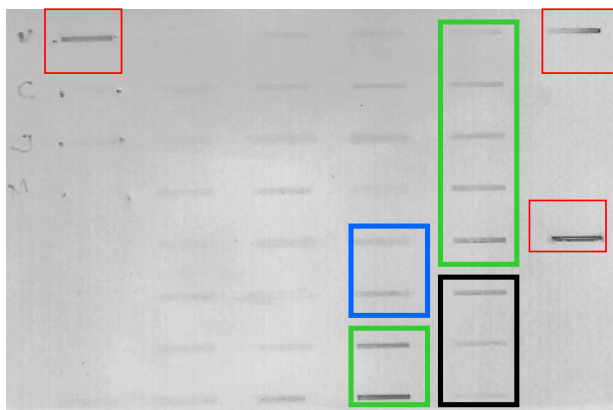
**Figura 15** Perfil cromatográfico da Purificação da DisBa-01 em coluna de Troca-Iônica (Mono Q).

Tampão A: Tris-HCl 20 mM pH 8.6, Tampão B Tris-HCl 20 mM NaCl 1M pH 8.6. Volume da fração : 1mL/minuto. mAU: unidade referente à absorbância, % : Porcentagem de condutividade, %B: porcentagem referente a concentração do tampão B.

As frações obtidas neste processo cromatográfico foram analisadas por SDS-PAGE (15%) (figura 16) e por imunodeteção (figura 17 e 18). Nas amostras referentes ao segundo pico da cromatografia foi detectada a presença da proteína de interesse em maior concentração. No início do segundo pico nas amostras ainda era possível detectar algum contaminante, mas na porção principal do pico a proteína foi detectada sem a presença de contaminante (figura 16 e 17).



**Figura 16:** Análise das amostras eluídas da cromatografia de Troca-Iônica. Purificação de frações eluídas da coluna Mono Q a partir das amostras obtidas da purificação parcial de níquel. Frações referentes ao pico 2 analisadas em SDS-PAGE 15%. A) M: marcador de massa molecular; 1-3 :frações referentes ao pico 1, 4-9: frações referentes ao pico 2 B) 1-9: frações referentes ao pico 3. Seta indica a banda referente a *DisBa-01*.



**Figura 17** Dot-Blot Anti-Histag.

As frações obtidas da cromatografia de Troca-Iônica foram analisadas em *imunoblotting* com o anticorpo anti-histag para a localização da proteína recombinante com cauda de histidina. Os quadrados vermelhos: amostra do primeiro passo cromatográfico (Níquel). Quadrado Azul: pico 1. Quadrado Verde: pico 2. Quadrado Preto: pico 3. Nesses 3 picos verificou-se a presença da proteína recombinante em diferentes concentrações

As frações correspondentes a presença da *DisBa-01* pura (pico 2) foram reunidas, dialisadas e concentradas. A concentração da proteína foi determinada por método colorimétrico BCA.

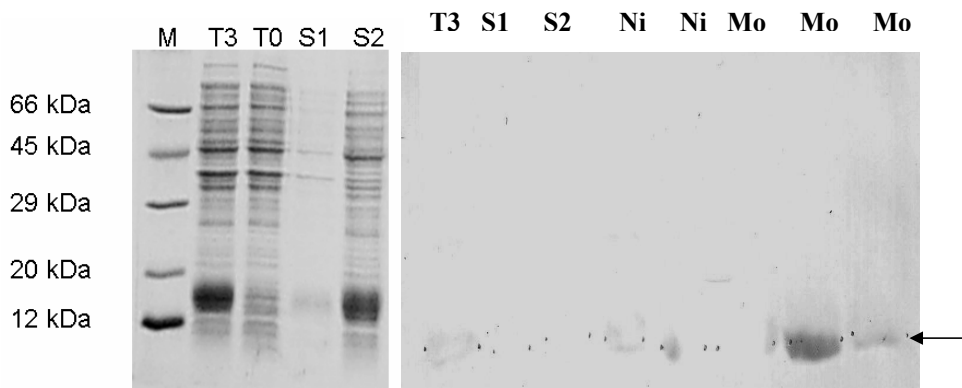
O rendimento de todo o processo de purificação da desintegrina recombinante *DisBa-01* pode ser analisado através da tabela 2

**Tabela 2** Purificação de *DisBa-01* recombinante em 1 Litro de cultura de células de *E.coli* BL21(DE3)p*DisBa-01*.

	Total de Proteína (mg)
<b>Inclusion bodies</b>	<b>3120</b>
<b>His-Bind column</b>	<b>23.44</b>
<b>MonoQ column</b>	<b>5.00</b>

O ensaio de expressão e solubilidade foi analisado também através de imunodeteção. A imunodeteção utilizou anticorpo anti-Histag (6XHIS) para a verificação

que a proteína superproduzida detectada no T3 e liberada no S2 tratava-se de uma proteína recombinante (figura 14). A proteína presente no extrato celular T3 e no sobrenadante desnaturante foi reconhecido pelo anticorpo específico para 6XHis N/C-Terminal ou histidinas internas.



**Figura 18** A) Ensaio de Expressão e Solubilidade. Análise de frações em SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue. M: marcador de massa molecular; T3: tempo de indução da cultura de bactérias com IPTG; T0: tempo anterior a indução da cultura de bactéria; S1: sobrenadante não desnaturante; S2: sobrenadante desnaturante. B) Imunodetecção das etapas de expressão e purificação com anticorpo anti-histag. T3: tempo de 3 horas após indução, S1: sobrenadante 1, S2: sobrenadante 2, Ni: purificação coluna de níquel, Mo: purificação coluna MonoQ, Seta preta: DisBa-01.

### 4.3 Seqüenciamento da Proteína Recombinante

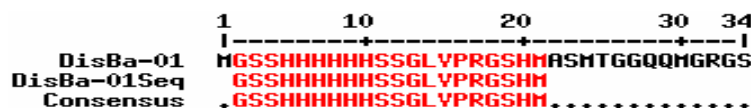
A proteína recombinante purificada foi submetida ao seqüenciamento automático pelo processo de degradação de Edman.

A DisBa-01 no final do processo de purificação, em solução e imobilizada na membrana de fibra de vidro, teve a região N-terminal referente à cauda de Histidina seqüenciada em 20 resíduos, confirmando se tratar de uma proteína recombinante (figura 19).

Seqüência	G	S	S	H	H	I	H	G	G	S	S	G	L	V	P	R	G	S	H	M
Confiabilidade(%)	43	100	87.6	100	45.6	12.4	15.5	19.9	26.5	39.5	71	22	100	100	100	100	100	100	28.2	100

**Figura 19.** Sequenciamento de aminoácidos da DisBa-01. Seqüência obtida através da degradação de Edmann dos aminoácidos N-Terminais da DisBa-01.

As seqüências obtidas foram analisadas usando o programa MULTALIN confirmando a similaridade entre as seqüências da DisBa-01 obtida pela dedução de seqüência primária a partir do vetor e a seqüência da proteína (figura 20).



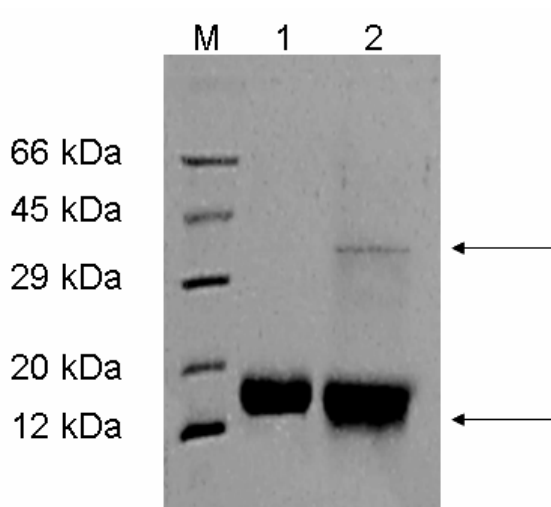
**Figura 20** Alinhamento das Seqüências da DisBa-01. A seqüência da proteína obtida pela técnica de degradação de Edman foi comparada com a seqüência predita da DisBa-01 obtida pelo sequenciamento do vetor de expressão (pDisBa-01) pelo programa MULTALIN. Os aminoácidos em vermelho representam alto grau de consenso (>90%) entre as seqüências.

**4.4 Ensaio de Clivagem com Trombina**

A DisBa-01 sem a proteína de fusão traduzida juntamente com a proteína de interesse foi obtida através da clivagem com uma serino protease, denominada trombina.

Uma única condição de clivagem (concentração de trombina e temperatura) foi testada. A eficiência da clivagem com trombina foi analisada em SDS-PAGE (15%) comparando com DisBa-01 não tratada com trombina. A DisBa-01 com a cauda de Histidina apresentou uma massa molecular maior que a DisBa-01 sem o peptídeo de fusão, devido à

massa do peptídeo (figura 21) e na amostra clivada há a presença da Trombina no gel de poliacrilamida.



**Figura 21** Ensaio de Clivagem com Trombina. Análise em SDS-PAGE 15%.  
M: marcador de massa molecular; 1: DisBa-01 com peptídeo de fusão; 2: DisBa-01 após a clivagem com trombina, banda superior referente a trombina e a banda inferior a DisBa-01 sem o peptídeo de fusão.

#### 4.5 Espectrometria de Massa

A DisBa-01-Histag foi submetida à ionização (eletrospray) de sua superfície formando íons multicarregados para a determinação da massa molecular referente a DisBa-01. Uma concentração baixa da proteína de interesse foi utilizada nesta técnica analítica. Devido ao pI da DisBa-01 ser 4.31, valor esse obtido através do programa Gene Runner 3.05 a partir da seqüência de aminoácidos da proteína depositada no GeneBank, número de acesso AAO75107, a proteína foi considerada ácida e capaz de sofrer a ionização (figura 22).



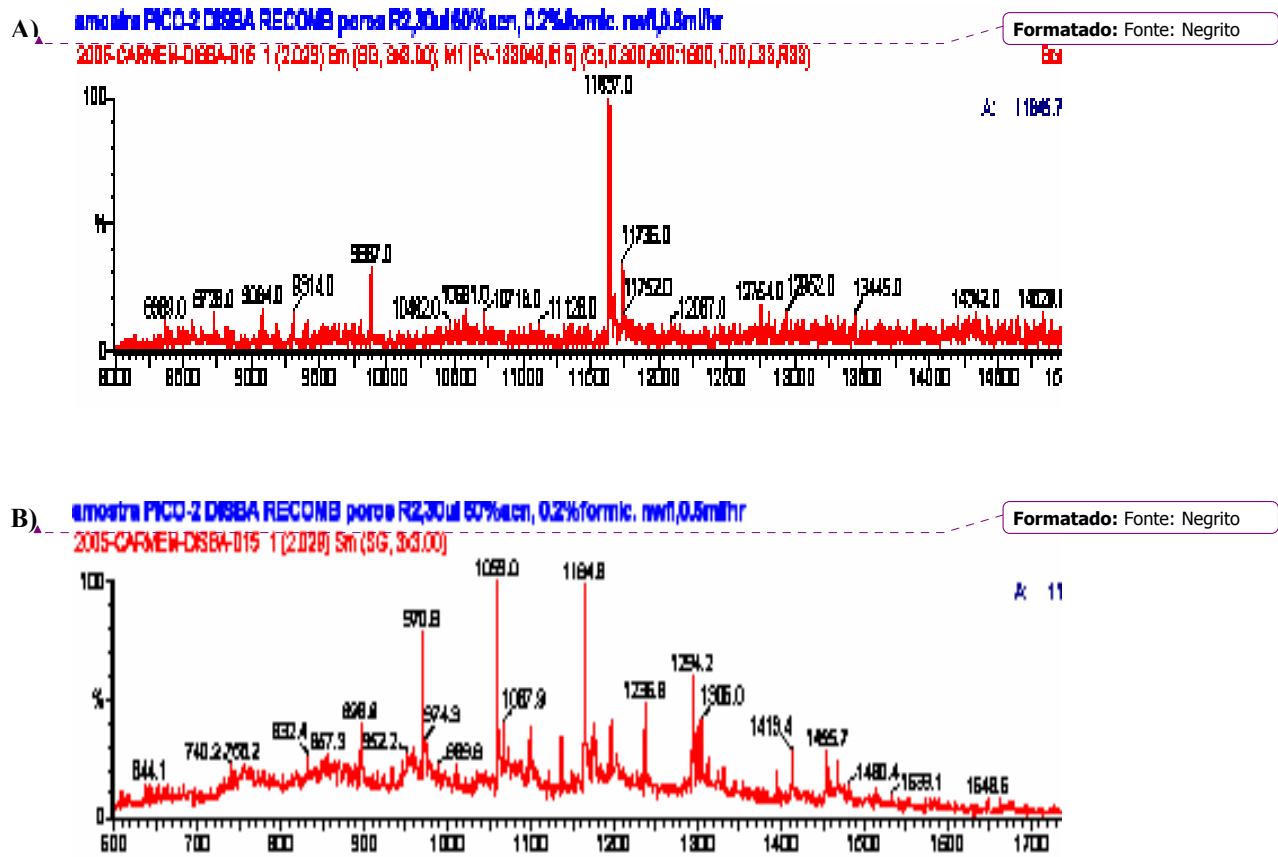


Figura 22 Espectrometria de Massa.

A figura A mostra o espectro referente a deconvolução dos íons e a determinação da massa da proteína.

A figura B mostra o espectro de ionização dos íons da superfície da DisBa-01 e revelam a massa da proteína.

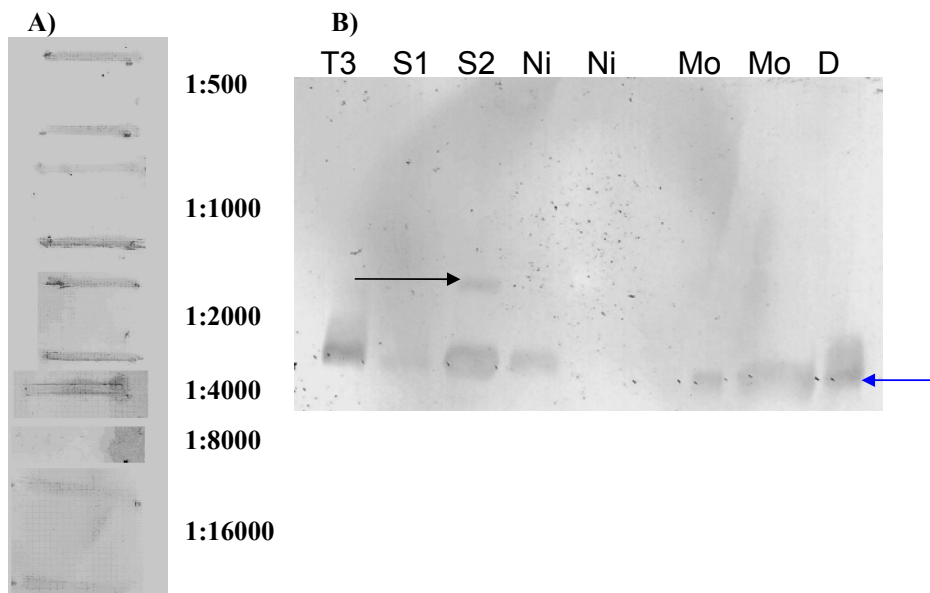
Neste espectro de massa, a DisBa-01 sofreu ionização completa verificada pela formação de uma curva em forma de sino côncavo com a ionização dos íons e a determinação da massa molecular foi determinada como 11.658 Da .

#### ***4.6 Obtenção dos Anticorpos Policlonais Anti-DisBa-01***

A produção dos anticorpos policlonais anti-DisBa-01 em camundongo foi obtida inoculando-se 50 ng da proteína em cada camundongo , duas vezes em um intervalo de tempo de 60 dias. Depois desse período, a sangria dos camundongos foi realizada, o sangue foi coletado e o soro imune obtido.

A partir desse soro diversas diluições foram realizadas e testadas em *Dot Blot* quanto ao reconhecimento de uma mesma massa conhecida de DisBa-01. O anticorpo anti-DisBa-01 foi capaz de reconhecer a proteína contra a qual eles foram produzidos. O soro com os anticorpos policlonais Anti-DisBa-01 nas várias diluições foi utilizado como anticorpo primário e Anti-IgG de mouse como anticorpo secundário (1:5000) (figura 23 A). O título encontrado para o anti-DisBa-01 foi 1:16000(figura 23A)

Depois de encontrado o título para o anti-DisBa-01, a reatividade imunológica dos anticorpos produzidos pelos animais foi verificada por *western blotting* (imunodeteção) e o anticorpo anti-DisBa-01 apresentou grande seletividade reativa com a DisBa-01 e pouca reação cruzada com outras proteínas produzidas pela bactéria (figura 23 B) .



**Figura 23** Titulação anticorpos anti-Dis*Ba*-01 em camundongos por dot blot.

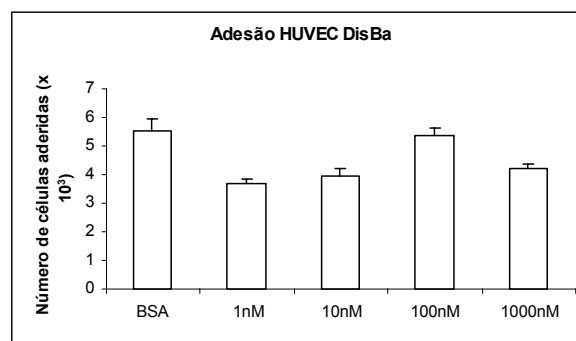
A) Títulos testados: 1:500; 1:1000;1:2000;1:4000;1:8000;1:16000 são títulos testados para os anticorpos. B) Imunodeteção com Anticorpos Anti-Dis*Ba*-01 (Diluição 1:16000) Todas as etapas da expressão e purificação da Dis*Ba*-01 foram analisadas quanto ao reconhecimento através do anticorpo produzido em camundongos. T3: tempo de 3 horas após indução, S1: sobrenadante 1, S2: sobrenadante 2, Ni: purificação coluna de níquel, Mo: purificação coluna MonoQ, D: Dis*Ba*-01 usada nos ensaios Seta azul: Dis*Ba*-01, Seta preta: reação cruzada.

#### 4.7 Ensaio Celulares

Os ensaios celulares de promoção da adesão, proliferação das células HUVECs foram realizados sob supervisão da profa.Dra. Verônica Morandi.

#### 4.7.1 Ensaio de Adesão Celular

O efeito da desintegrina foi testado em células endoteliais HUVEC ( $3 \times 10^4$  células/poço) durante o tempo de 4 horas. Depois desse tempo, as células foram lavadas com tampão PBS e foi adicionado MTT com o meio de cultura das células ( $50 \mu\text{l/poço}$ ). Depois de 4 horas de incubação a placa foi lida a 595 nm (figura 24).



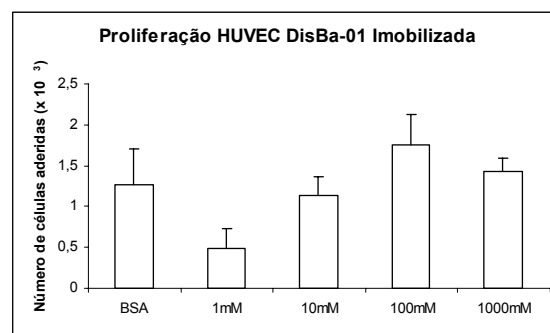
**Figura 24** Efeito da DisBa-01 na adesão de células endoteliais (HUVEC). BSA: controle, 1nM, 10nM, 100nM e 1000nM, : contrações de DisBa-01 testadas .

Nas concentrações testadas houve uma inibição da adesão nas concentrações de 1nM, 10nM e 1000nM.

#### 4.7.2 Ensaio de Proliferação

O efeito da desintegrina foi testado em células endoteliais HUVEC ( $1 \times 10^4$  células/poço) durante o tempo de 72 horas. Depois desse tempo, procedeu-se igualmente ao ensaio de adesão celular (figura 25 e 26).

##### 4.7.2.1 Proteína Imobilizada nos poços

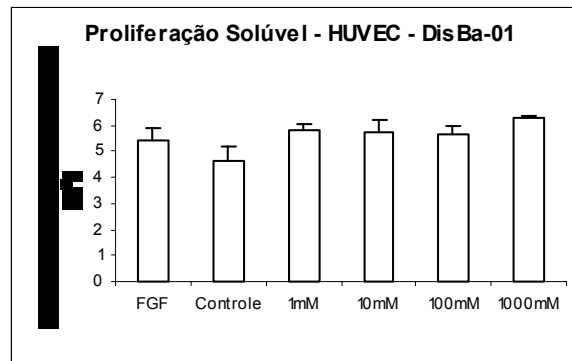


**Figura 25** Efeito da DisBa-01 na proliferação de células endoteliais (HUVEC) com a toxina imobilizada nos poços.

Nas concentrações testadas houve uma inibição da proliferação nas concentrações de 1nM e 10nM

## Proteína Solúvel

### 4.7.2.2 Proteína Solúvel nos poços



**Figura 26** Efeito da DisBa-01 na proliferação de células endoteliais (HUVEC). FGF: controle positivo, Controle negativo, 1nM, 10nM, 100nM e 1000nM: contrações de proteína testada.

Nas concentrações testadas, não houve efeito significativo sobre a proliferação das células endoteliais.

## 5 DISCUSSÃO

Com os modernos avanços na genômica, proteômica e bioinformática, o número de proteínas que estão sendo produzidas usando técnicas recombinantes está aumentando exponencialmente (ARNAU, 2006). O uso de tecnologia de DNA recombinante para a expressão de proteínas em células eucarióticas como em procarióticas é uma técnica bem aceita (JENNY, 2003). Agora o desafio é elucidar a localização celular, funções biológicas, caracterização bioquímica das proteínas preditas e identificar aquelas que podem servir como alvos para a intervenção terapêutica em várias doenças (WANG, 2004 ARNAU, 2006). Neste cenário que a *DisBa-01* está inserida.

Para conseguir estes objetivos, alguns métodos rápidos, confiáveis, e econômicos para produzir proteínas recombinantes são necessários (WANG, 2004). A expressão heteróloga com proteína de fusão, que pode ser usada subsequente para a purificação, é uma estratégia popular usada extensamente na produção de proteínas geneticamente projetadas (FANG, 2006). Para esta finalidade, as diferentes cepas de expressão (por exemplo, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) têm sido utilizadas em processos para expressar proteínas heterólogas (ARNAU, 2006).

Dentre os métodos para produzir as proteínas recombinantes, o sistema pET é um dos sistemas mais eficientes de expressão em *E. coli*. Além do nível elevado da expressão, o sistema pET oferece outras duas vantagens principais. Primeiramente, permite a clonagem de genes alvo que codificam produtos muito tóxicos. Isto é conseguido usando cepas especiais de bactérias de clonagem. Em segundo, há muitas cepas de expressão com diferentes propriedades a escolher. Isto permite a otimização da expressão da proteína e fornece

flexibilidade para realizar os objetivos diferentes pretendidos para as proteínas recombinantes (WANG, 2004).

Neste contexto a *DisBa-01* é uma proteína expressa heterologicamente em *E.coli* utilizando o sistema pET 28 a. O rendimento da *DisBa-01* foi alto podendo ser verificado nas figuras 12 e 13 e tabela 2. Nestas figuras também podemos notar que a proteína de estudo não se encontra na forma solúvel, estando presente na forma de corpos de inclusão, sendo recuperados através de agentes desnaturantes (Uréia 6M).

A purificação da proteína de estudo, *DisBa-01* foi realizada em condições desnaturantes e através da utilização de uma característica inserida na construção do sistema de expressão heteróloga, a presença de um peptídeo de fusão (tag) de seis histidinas no N-terminal da *DisBa-01*.

Pesquisas revelam que Tags de afinidade têm sido utilizados na: (i) melhora do rendimento da proteína, (ii) no impedimento da proteólise, (iii) na facilitação do reenovelamento da proteína, (iv) proteção da antigenicidade da proteína da fusão, e (v) no aumento da solubilidade. Por outro lado, adicionar um Tag pode também ter um efeito negativo na proteína alvo, tendo por resultado (i) uma mudança na conformação da proteína, (ii) nos rendimentos mais baixos da proteína, (iii) na inibição da atividade de enzima, (iv) na alteração na atividade biológica, (v) na flexibilidade indesejada nos estudos estruturais e (vi) toxicidade (ARNAU, 2006). No caso específico da *DisBa-01*, o tag de afinidade (Polihistidinas) promoveu um bom rendimento da proteína. No entanto, o Tag de afinidade permitiu a purificação inicial desta proteína em coluna de afinidade ao níquel.

FANG *et al.* (2006) sugerem que a purificação de afinidade usando Tag de fusão, como a tioredoxina (TRX), glutatona S-transferase (GST), proteína ligante de maltose (MBP), proteína A permite a purificação de muitas proteínas em um único passo e melhora às vezes o rendimento e a solubilidade da proteína alvo.. Como pode ser visto na figura 14,



referente a cromatografia de afinidade em coluna de níquel, a proteína de estudo é obtida através dessa cromatografia porém, no entanto, não de uma forma pura.

Anteriormente no protocolo estabelecido por RAMOS (tese de doutorado, 2005), este passo de purificação era feito sem um gradiente linear de Imidazol. A proteína de estudo era eluída em diversas frações ao longo de uma eluição isocrática (Tampão de Eluição). No protocolo estabelecido no atual trabalho, a utilização do gradiente linear de imidazol primeiramente aumentou o grau de pureza da amostra, mas não o suficiente para dispensar outros passos cromatográficos de purificação, e o número de frações nas quais é detectada a DisBa-01 diminuiu consideravelmente. Isto se torna um ponto positivo uma vez que essa proteína é eluída com tampão desnaturante e para o prosseguimento da purificação, é necessário o uso de sucessivas diálises. Em um volume menor de proteína para dialisar, a possibilidade de perda protéica é menor.

Outra modificação no protocolo de purificação foi realizada na etapa de purificação subsequente a cromatografia de afinidade. No protocolo anterior, fração de proteína eluída da coluna de Níquel era submetida a uma cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75) na qual a proteína era obtida extremamente diluída com rendimento muito baixo e baixa resolução. Esta etapa foi substituída por uma cromatografia de troca-iônica, em resina Mono Q, em um sistema de alta resolução.

Nas figuras 15, 16 e 17 podemos ver que esta mudança no segundo passo de purificação, no protocolo de obtenção da DisBa-01 trouxe maior grau de pureza para a amostra da DisBa-01 verificado por gel de poliacrilamida e imunodeteção, além de um bom rendimento dessa etapa de purificação, pois a proteína sai concentrada principalmente nas frações relacionadas ao pico 2, e a redução do tempo requerido para a obtenção dessa proteína pura. Anteriormente, o rendimento protéico obtido por litro de cultura de bactéria era de 3 mg, no atual protocolo o rendimento de proteína é de 5 mg por litro de cultura. Adicionalmente,

no protocolo estabelecido anteriormente, um terceiro passo de purificação era utilizado, cromatográfica de fase reversa, C18, que agora não é mais necessário visto que a proteína obtida da purificação de troca-iônica (pico 2) já pode ser usada para estudos de caracterização bioquímica e efeitos biológicos.

Um criterioso procedimento de verificação de todos os passos desde a produção heteróloga da *DisBa-01*, passando por todos os passos de purificação até a obtenção dela pura foi realizado através de gel de poliacrilamida e imunodeteção com anticorpo anti-Histag. Este anticorpo mostrou que a proteína que é expressa de forma heteróloga e obtida através do procedimento de purificação acima relatado, trata-se de uma proteína recombinante com uma cauda de Histidina C-ou N-terminal.

O sequenciamento N-Terminal dessa proteína foi realizado com sucesso para mais uma vez confirmar que a proteína que está sendo utilizada em diversos estudos trata-se de uma proteína recombinante de *Bothrops alternatus*. O resultado obtido através da degradação de Edman dos 20 primeiros aminoácidos da *DisBa-01*, com alta porcentagem de confiabilidade dos aminoácidos obtidos, revelou novamente que a proteína era recombinante pois esses 20 aminoácidos são referentes ao peptídeo de fusão na qual estão presente as seis histidinas. Estes resíduos são responsáveis pela interação da proteína à coluna de níquel, que favorece a eluição e separação da *DisBa-01* das proteínas restantes do extrato da bactéria e formam o segmento que o anticorpo anti-histag reconhece e ao qual liga na reação de imunodeteção. No entanto, esses 20 aminoácidos conseguidos nesse sequenciamento correspondem ao peptídeo de fusão e, em uma única etapa de sequenciamento não foi possível chegar ao N-terminal da *DisBa-01*.

Uma protease foi utilizada para a obtenção da *DisBa-01* livre da proteína de fusão, sem o *tag* de afinidade, para assim confirmar a seqüência da estrutura primária da *DisBa-01* a partir de seqüência de aminoácido e não apenas por tradução da seqüência de

nucleotídeo. A reação de clivagem da proteína de fusão com trombina só foi possível pela presença na construção do vetor de expressão pDisBa-01 de uma região reconhecida por essa protease. A clivagem do *tag* de afinidade foi monitorada por gel de poliacrilamida que revelou a redução do peso molecular da proteína se comparada com ela mesma ainda com cauda e a não existência de outros subprodutos da digestão, portanto a proteína só tinha uma região de reconhecimento para trombina não sendo digerida enzimaticamente.

A necessidade da proteína recombinante sem a proteína de fusão não é apenas necessária para a determinação da estrutura primária da proteína, mas também para aplicações terapêuticas (ARNAU, 2006).

A proteína recombinante com a cauda de histidina foi utilizada para a obtenção de anticorpos policlonais em camundongos. A especificidade dos anticorpos policlonais foi analisada usando imunodeteção. Analisando a figura 23, ela nos permite concluir que os anticorpos policlonais anti-DisBa-01, titulados por ELISA e dot blot, são altamente específicos contra o antígeno DisBa-01, e isto inclui a pouca reatividade com outras proteínas do extrato celular da bactéria, por exemplo. Deste modo, esses anticorpos policlonais poderão servir como ferramentas para o “*screening*” do veneno de *Bothrops alternatus* na busca por desintegrinas RGD presentes no veneno bruto, inclusive da DisBa-01 nativa ainda não purificada diretamente do veneno. Assim como utilizar esses anticorpos em ensaios celulares juntamente com a desintegrina para verificar os efeitos biológicos que vem sendo relatado (RAMOS, tese de doutorado, 2005) e também verificar as atividades referentes as integrinas que supostamente a DisBa-01 interage, entre outras atividades para esses anticorpos. Não apenas a DisBa-01 mas proteínas recombinantes em geral são amplamente usadas como imunógenos para promover a produção de anticorpos específicos (CHUMPPIA, 2003).

Um outro método de caracterização estrutural além do sequenciamento do N-terminal da DisBa-01 foi realizado nesse trabalho. Em colaboração com o Prof.Dr. José César

Rosa, da Universidade de São Paulo (USP-RP), do Centro de Química de Proteínas, a DisBa-01 foi ionizada e teve a sua massa determinada em 11645 +- 12.45 Da.

No entanto, a massa molecular da DisBa-01 com o peptídeo de fusão predita pelo programa de Gene Runner 3.01 baseada na seqüência traduzida dos nucleotídeos é de 11781 Da. Essa pequena discrepância nos valores predito e obtido pela espectrometria de massa, se considerarmos o valor de 11645 + 12.45, resultando em 11658 Da, pode ser analisada como a diferença de um aminoácido. Muito provavelmente seja a metionina inicial que após a sua tradução foi retirada da seqüência primária, fato esse que ocorre em alguns organismos e um dos poucos processamentos feitos em *E.coli*. Isso somente o sequenciamento de aminoácidos da região N-terminal da DisBa-01 poderá confirmar.

Algumas desintegrinas RGD e não RGD tem sido clonadas e expressas de forma heteróloga mantendo as atividades encontradas nas desintegrinas nativas. A controtrostatina é uma dessas desintegrinas RGD isoladas do veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix* que apresentou potente atividade anti-tumoral e anti-angiogênica em numerosos modelos de câncer humano. A CN recombinante foi eficientemente produzida na forma solúvel e altamente expressa em sistema bacteriano recombinante (MINEA, 2005).

MINEA *et al.* foram capazes de gerar uma forma recombinante monomérica solúvel da CN que mantém a atividade da CN nativa (rCN+). A rCN+ por apresentar as mesmas atividades funcionais da nativa parece estar conformacionalmente ativa, preservando o “loop” de ligação à integrina.

Outra desintegrina é a bothrostatina, uma desintegrina RGD também expressa em *E.coli* e que mostra ser altamente ativa na inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno. Estudos indicam que essa desintegrina pode ser usada para estudos de interação integrina/ligante (FERNANDEZ, 2005). A kistrina também é outra desintegrina

recombinante RGD que tem a atividade da proteína recombinante comparada com a nativa quanto a potência e especificidade (TSELEPIS, 1997).

Essas proteínas ricas em cisteínas, como as desintegrinas mantêm a estrutura e conseqüentemente a função graças à formação correta das pontes de dissulfeto. No entanto, essas proteínas ricas em pontes de dissulfeto no sistema de expressão heterólogo em bactérias podem apresentar dificuldades de formação dessas ligações e assim representar um obstáculo na obtenção de proteínas ativas.

As diversas desintegrinas que ao longo dos anos vem sendo expressas na forma recombinante e tem a sua estrutura e função caracterizadas, inclusive a *DisBa-01*, tornam-se bons modelos para o desenvolvimento de novos fármacos e terapias para diversas doenças, uma vez que essas moléculas são encontradas em pequena quantidades no veneno bruto e essas serpentes podem algum dia entrar em extinção.

Os ensaios celulares realizados com células endoteliais (HUVEC) apesar da necessidade de repetição para a realização de uma análise estatística nos indica alguns fatos interessantes.

No ensaio de adesão celular, a *DisBa-01* mostra a tendência de inibir a adesão da célula endotelial ao substrato nas concentrações de 1nM e 10nM. Também no ensaio de proliferação com as células imobilizadas nos poços, a desintegrina foi capaz de inibir a proliferação nas mesmas concentrações que no ensaio de adesão (1nM e 10nM).

No ensaio de proliferação celular com a desintegrina solúvel no meio de cultura, a *DisBa-01* não foi capaz nem de promover nem de inibir a proliferação da célula endotelial HUVEC.

A agregação plaquetária realizada com a proteína recombinante obtida através desse novo método de purificação (dados não mostrados) confirmou a manutenção da atividade da *DisBa-01* causando inibição da agregação. Isto indica que as tendências

mostradas nos ensaios celulares com HUVECs devem ser realmente causadas pela ação dessa desintegrina na cultura celular.

Deste modo, novos ensaios deverão ser realizados para a obtenção de mais dados e confirmação dos efeitos da DisBa-01 e a realização da análise estatística.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Um método mais eficiente de purificação foi estabelecido. A *DisBa-01* é obtida com maior grau de pureza e de uma forma mais rápida;
- ✓ A *DisBa-01* teve seu N-Terminal seqüenciado com alta confiabilidade, confirmando a presença da cauda de histidina;
- ✓ A clivagem com trombina foi eficiente, clivou apenas a cauda de histidina N-terminal e deixou a proteína intacta;
- ✓ A espectrometria de massa determinou o peso molecular da proteína com 1 aminoácido a menos se comparado com o predito pela análise nucleotídica;
- ✓ Os anticorpos mostraram alta especificidade ao antígeno com baixa reação cruzada;
- ✓ Ensaio celulares confirmam a manutenção da função;
- ✓ *DisBa-01*, rica em cisteína, é expressa em sistema bacteriano com boa eficiência.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A *DisBa-01* tem mostrado ser uma desintegrina-RGD com bons efeitos como antagonista de eventos biológicos promovidos pela ligação das integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_{IIb}\beta_3$  a seus ligantes em diversas patologias, especialmente trombose e metástases tumorais. Em virtude disso, ela torna-se um promissor protótipo para o desenvolvimento de fármacos.

No entanto, por ela ser obtida de forma recombinante, que por um lado é extremamente bom para a obtenção de grandes quantidades dessa proteína em escala industrial em bioreatores, por outro há a questão da imunogenicidade de produtos recombinantes. O *tag* de histidina pode causar alguma reação no organismo e ser combatido como corpo estranho e eliminado do organismo antes mesmo de causar o seu efeito. Deste modo, uma nova construção dessa proteína sem *tag* de histidina poderia ser construído e utilizar os anticorpos policlonais produzidos contra a *DisBa-01* com cauda de histidina imobilizados em uma coluna como modo de purificação dessa nova construção. Além disso, novos testes com outras linhagens celulares deverão ser realizados para verificar o potencial de ação dessa desintegrina.



**8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

ALIMENTI, E.; TAFURI, S.; SCIBELLI, A.; D'ANGELO, D.; MANNA, L.; PAVONE, L. M. et al. Pro-apoptotic signaling pathway activated by echistatin in GD25 cells. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1693, n. 1, p. 73-80, 2004.

APESTEGUÍA,S., ZAHER, H. A Cretaceous terrestrial snake with robust hindlimbs and a sacrum. **Nature**, 440, p.969-1088, 2006.

ARANAU, J., LAURITZEN, C., PETERSEN, G.E., PEDERSEN J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein.Expr. and Pur.**, v48, p. 1-13, 2006.

BECKER,T.,MCLANE,M.A., BECKER,C. Integrin antagonist affect growth and pathfinding of ventral motor nerves in the trunk of embryonic zebrafish. **Molec. And Cell.Neur.**v.23,p.54-68,2003.

BICUDO,F. As patas da serpente.**Rev.Fapesp**, v.123, 2006.

BIRKEDAL-HANSEN,H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr.Opin.in Cell Biol.** v.7, p. 728-735, 1995.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol.Ther.**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994

BOUDREAU,N., BISSELL,M.N. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. **Curr.Opin.in Cell Biol.**v.10,p. 640-645, 1998.

BRASIL. Ministério da saúde. Fundação nacional de saúde (FUNASA). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos 2001, 112p.

BROOKS, P. C.; MONTGOMERY, A. M.; ROSENFELD, M.; REISFELD, R. A.; HU, T.; KLIER, G. et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1157-1164,1994.

BROOKS, P.C. Role of Integrins in Angiogenesis. **Eur.Jou. of Can.**v.328, p.2413-2429, 1996.

BUTANTÃ. Série didática 5, acesso 07/08/2006  
<http://www.butantan.gov.br/materialdidatico/numero5>

BURRIDGE, K., CHRZANOWSKA-WODNICKA,M. Focal adhesions, contractility, and signaling. **Ann.Rev.Cell Dev.Biol.**, v.12, p. 463-519, 1996.

CADLE, J.E. The geographic distribution of snakes: problems in phylogeny and zoogeography.**Snakes: ecology and evolutionary biology**, p.77-105, 1987.

CAL,S., FREIJE,J.M.P., LÓPEZ,J.M., TAKADA, Y., LÓPEZ-OTÍN, C. ADAM23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the  $\alpha_v\beta_3$  Integrin through an RGD-independent mechanism. **Molec. Biol.of Cell**, v.11, p.1457-1469, 2000.

CALVETE, J. J.; MORENO-MURCIANO, M. P.; THEAKSTON, R. D.; KISIEL, D. G.; MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem.J.**, v. 372, n. Pt 3, p. 725-734, 2003.

CALVETE, J.J. Structure-Function Correlations of Snake Venom Disintegrin. **Curr.Pharm. Design**. v.11, p. 829-835, 2005.

CALVETE,J.J., SCHRADER,M., RAIDA, M. et al. The disulphide bond pattern of bistratin, a Disintegrin isolated from the venom of the viper *Bitis arietans*. **FEBS Letters**. V.416, p.197-202, 1997.

CALVETE,J.J., FOX, J.W., AGELAN,A., *et al* The presence of the WGD motif in CC8 heterodimeric disintegrin increases its inhibitory effect on  $\alpha IIb\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins. **Biochem.**,v. 41, p. 2014-2021, 2002

CAWSTON, T.E. Metalloproteinase Inhibitors and the Prevention of Connective Tissue Breakdown. **Pharmacol.Ther**. v.70, p.163-182, 1996.

CHAIKIN, M., MARUGAN, J.J., VRIES, G.W.D., *et al* A functional radioreceptor assay of alpha-V-beta-3 inhibitors in plasma. Application asan ex vivo pharmacodynamic model.**J.Biochem Meth.**, v.65, p.107-120, 2005.

CHANG, C. P.; CHANG, J. C.; CHANG, H. H.; TSAI, W. J.;LO, S. J. Positional importance of Pro53 adjacent to the Arg49-Gly50-Asp51 sequence of rhodostomin in binding to integrin  $\alpha IIb\beta 3$ . **Biochem.J.**, v. 357, n. Pt 1, p. 57-64, 2001.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol.**, v. 11, n. 11, p. S37-S43, 2001.

CHEN, R-Q, JIN, Y., WU, J-B *et al* A new structure of P-II class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and Disintegrin domains. **Biochem. And Biophy. Comm**. v. 310, p. 182-187, 2003.

CHEN, T., BJOURSON,A.J., ORR,D.F., *et al* Unmasking venom gland transcriptomes in reptile venoms. **Anal.Biochem.**, v.311, p.152-156, 2002.

CHEN, T-F., ZHANG, Y-L., XU, W-L., *et al* Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation, and sub-cellular localization analysis of  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase  $\alpha 2$  subunit. **Protein Expr.and Puri**, v.37, p. 47-52, 2004.

CHEN,X., PLASENCIA,C., HOU,Y., NEAMATI,N. Synthesis and Biological Evaluation of Dimeric RGD Peptide-Pelitaxel Conjugate as a Model for Integrin-Targeted Drug Delivery.**Jour. Med.Chem.**, v.48, p.1098-1106, 2005

CHIPPAUX,J.P., WILLIAMS,V., WHITE,J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**,v.29, p.1279-1303, 1991.

CHUMPIA, W., OHSATO, T., KUMA, H., *et al.* Affinity purification of antibodies by using Ni 2b-resins on which inclusion body forming proteins are immobilized. **Prote. Expr. and Puri.**, v.32, p.147-150, 2003.

COELHO, A. L.; DE FREITAS, M. S.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; RAPOZO, D. C.; PINTO, L. F.; NIEWIAROWSKI, S. *et al.* RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. **Exp. Cell Res.**, v. 292, n. 2, p. 371-384, 2004.

COMINETTI, M. R.; RIBEIRO, J. U.; FOX, J. W.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with alpha5beta1 integrin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 416, n. 2, p. 171-179, 2003.

COMINETTI, M. R.; TERRUGGI, C. H.; RAMOS, O. H.; FOX, J. W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M. S. *et al.* Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 18, p. 18247-18255, 2004.

DALTRY, J.C., WÜSTER, R.S., THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. **Nature.** v.379, p.537-540, 1996.

DECLERCK, Y. A. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. **Eur. Jour. Cancer.** v.36, 1258-1268, 2000.

FANG, L., JIA, K.-Z., TANG, Y.-L., *et al.* An improved strategy for high-level production of TEV in *Escherichia coli* and its purification and characterization. **Prot. Expr. and Puri.**, In Press, Uncorrected Proof, 2006.

FERNADEZ, J.H., SILVA, C.A., ASSAKURA, M.T. *et al.* Molecular cloning, functional expression, and modeling of bothrostatin, a new highly active Disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Biochem. And Biophys Reser. Comm.** v.329, p. 457-464, 2005

FOX, J.W., SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon.** v.45, p. 969-985, 2005.

FRANCISCETTI, I. M., GHAZALEH, F.A., REIS, R.A.M., *et al.* Convulxin induces platelet activation by a tyrosine-kinase-dependent pathway and stimulates tyrosine phosphorylation of platelet proteins, including PLC- $\gamma$ 2, independently of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. **Arch. Biochem. Biophys.** v.354, p. 239-250, 1998.

FRIEDERICH, C., TU, A.T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem. Pharmac.** v.20, p.1549-1556, 1971.

GALLAGHER, P., BAO, Y., SERRANO, S.M.T, *et al.* Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: In vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. **Arch. Biochem. Biophys.** v.441, p.1-15, 2005.

GAY, C.C., LEIVA, L.C., MARUNÁK, S., *et al* Proteolytic edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**. v.46, p.546-554, 2005.

GOLUBKOV,V., HAWES,D., MARKLAND, F,S. Anti-angiogenic activity of contortrostatin, a Disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix* snake venom.**Angiogenesis**. v.6, p. 231-224, 2003.

GOULD, R. J.; POLOKOFF, M. A.; FRIEDMAN, P. A.; HUANG, T. F.; HOLT, J. C.; COOK, J. J. et al. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med**, v. 195, n. 2, p. 168-171, 1990

GUTIÉRREZ, J.M., NÚÑEZ, J., ESCALANTE, T., RUCAVADO, A. blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. **Micro.Resear**. v71.p.55-63, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVADO, A., ESCALANTE, T., DÍAZ,C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v.45, p.997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie** v. 82, p. 841-850, 2000.

HEINO, J . The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. **Matix Biology**.v.19, p.319-323, 2000.

HERSEL, U., DAHMEN,C., KESSLER,H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. **Biomaterials**, v.24, p. 4385-4415, 2003.

HO, P. L. *et al*..Angiostatin-like molecules are generated by snake venom metalloproteinases. **Biochem. Bioph. Resear. Comun**..v.294, p.879-885, 2002.

HONG, S-Y., KOH, Y-S., CHUNG, K-H, KIM, D-S. Snake venom Disintegrin, saxatlin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. **Throm. Reser**. v.105, p. 79-86, 2002.

HOOPER, N.M. Families of Zinc metalloproteases. **FEBS Letters**. v. 354, p. 1-6, 1994.

HOWE, A., APLIN, A.E., ALAHARI, S.K.,JULIANO, R.L. Integrin signaling and cell growth control. **Curr. Opin. In Cell Biol**. v.10, p. 220-231, 1998.

HYNES, R. O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines.**Cell**.v.110, p373-687, 2002.

HYNES, R.O. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. **Nat.Med**. v.8, p. 918-921, 2002.

HYNES, R.O. Millenium Issue - Cell adhesion old and new question. **Trends in Genetics**, v.15,p.M33, 1999.

IBAMA. Serpentes peçonhentas Acesso 08/08/2006 [www.ibama.gov.br/ran/](http://www.ibama.gov.br/ran/)

- IEMMA, M.R.C. **Metaloproteases-desintegrinas de venenos de serpentes: purificação, expressão heteróloga e interação com a integrina  $\alpha_2\beta_1$** . 2002.123p. Tese (Doutorado em Fisiologia).
- JENNY, R.J., MANN, K.G., LUNDBLAD, R.L. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. **Prot. Expr. and Pur.** v. 31, p. 1-11, 2003.
- JIA, L. G.; SHIMOKAWA, K. I.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Function and Relationship to the ADAMS family of proteins. **Toxicon**.v.34, p.1269-1276, 1996.
- KAMIGUTI, A.S. *et al* Identification of sites in the cystein-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. **FEBS lett.** V.549, p.129-134, 2003.
- KAMIGUTI, A.S., ZUZEL, M., THEAKSTON, R.D.G. Snake Venom-metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Biol. Reser**, v.31, p. 853-862, 1998.
- KANG, I.C., KANG, I.C., KIM, D.S. *et al* Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin, in B16 melanoma cell metastasis. **Biochem.Biophys.Res.Comun.**v.275, p. 169-173, 2000
- KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **Brit.Jour.of Anaest.**v.74, p. 319-327, 1995.
- KEOGH, J.S. Molecular phylogeny of elapid snake and a consideration of their biogeographic history. **Biol. Jour. Of the Linn.Soc.** v.63, p. 177-203, 1998.
- KISHIMOTO, M., TAKAHASHI, T. Molecular cloning of HR1a and HR1 b, high molecular hemorrhagic factors, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **Toxicon**. V.40, p. 1369-1375, 2002.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LEWIS, R.J., GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat.Rew.**v.2, p.790-802, 2003.
- LOFTUS, J., SMITH, W., GINSBERG, M. Integrin mediated Cell Adhesion: The Extracellular Face. **The Journ.of Biol. Chem**, v.14, p.25235-25238, 1994
- LU, Q., CLEMETSON, M., CLEMETSON, K.J. snake venoms and hemostasis. **Journ. of Thromb. and Haem.** v.3, p.1791-1799, 2005.
- MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A. L.; TERRUGGI, C. H.; SELISTRE-DEARAUJO, H. S.; BARJA-FIDALGO, C.; DE FREITAS, M. S. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur.J.Biochem.**, v. 270, n. 24, p. 4799-4808, 2003.

MARSH, N., WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicol.** v. 45, p.1171-1181, 2005.

MARUYAMA, M., SUGIKI, M., ANAI, K., YOSHIDA, E. N-terminal amino acid sequence and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicol.** v 40, p.1223-1226 , 2002.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Bioch. et Bioph Acta.** v. 1477, 146-156, 2000.

MCLANE, M. A.; KUCHAR, M. A.; BRANDO, C.; SANTOLI, D.; PAQUETTE-STRAUB, C. A.; MIELE, M. E. New insights on disintegrin-receptor interactions: ristostatin and melanoma cells. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 177-182, 2001.

MCLANE, M. A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKAPATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S. Viper venom disintegrins and related molecules. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v. 219, n. 2, p. 109-119, 1998.

MCLANE, M. A.; SANCHEZ, E. E.; WONG, A.; PAQUETTE-STRAUB, C.; PEREZ, J. C. Disintegrins. **Curr.Drug Targets.Cardiovasc.Haematol.Disord.**, v. 4, n. 4, p. 327-355, 2004.

MENEZES, M.C., FURTADO, M.F., TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.*et al* Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicol.** v.47, p. 304-312, 2006.

MINEA, R., SWENSON, S., COSTA, F., CHEN, T.C. Development of a novel recombinant Disintegrin contortrostatin, as an effective anti-tumor and anti-angiogenic agent. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.** v. 34, p. 177-183, 2005.

MORENO-MURCIANO, M.P., MONLEÓN, D., CALVETE, J.J *et al*. Amino acid sequence and homology modeling of obtustatin, a novel non-RGD-containing short didintegrin isolated from the venom of *Vipera lebetina obtuse*. **Prot. Sci.** V.12, p. 366-371, 2003.

MOURA-DA SILVA, A.M., DELLA-CASA, M.S., DAVID, A.S. *et al*. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Arch.of Bioch. and Bioph.** v.409. p. 395-401, 2003.

MOURA-DA-SILVA *et al.* Jararhagin ECD-Containing Disintegrin Domain: Expression in *Escherichi coli* and Inhibition of the Platelet-Collagen Interaction. **Arch. of Bioch. and Bioph.**.v.369, .p.295-301, 1999.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; MARCINKIEWICZ, C.; MARCINKIEWICZ, M., *et al*. Selective recognition of  $\alpha 2\beta 1$  integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Trom.Reserch.**v.102, p.153-159, 2001.

NIEWIAROWSKI, S., MCLANE, M.A., KLOCZWIAK, M. & STEWART, G.J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Sem.Hematol.**,v.31,p289-300,1994.

OJIMA, I., CHAKRAVARTY, S., DONG, Q. Antithrombotic Agents: From RGD to Peptide Mimetics. **Bioorg. & Med. Chem.** v.3, p. 337-360, 1995.

PETRETSKI,J.H., KANASHIRO, M.M., RODRIGUES, F.R., *et al.* Edema Induction by the Disintegrin-like/Cysteine-Rich Domains from a *Bothrops atrox* Hemorrhagin. **Biochem.Biophys.Reser.Comun**, v.276, p.29-34, 2000.

RAMOS, O.H.P. **Desintegrinas de *Bothrops alternatus*: Biologia Molecular, estudos “in vitro”, “in vivo” e bioinformatica estrutural.** 2005.152p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução).

RAMOS, O.H.P., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Snake venom metalloproteases\_ struture and function of catalitic and Disintegrin domains. **Comp. Bioch. and Phys.** v. 142, p. 328-346, 2006.

RIBEIRO, J.U. **Obtenção de uma desintegrina recombinante de *Agkistrodon contortrix laticinctus* e Edtudos dos efeitos de desintegrinas na expressão do fator de crescimento de endotélio vascular.** 2005. 99p. Dissertação ( Mestrado em Genética e Evolução).

RIBEIRO, L.A., JORGE, M.T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops* série de 3.139 casos. **Revis.Socie.Bras.Med.Trop.** v.30, p.475-480, 1997.

ROODT, A.R., LITWIN, S., VIDAL, J.C. Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality.**Toxicon**, v.41, p. 949-958, 2003.

RUOSLAHTI, E.; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **Cell**, v. 64, n. 5, p. 867-869, 1991.

SCHWETTMANN, L.; TSCHESCHE, H. Cloning and Expression in *Pichi pastoris* of Metalloprotease Domain of ADAM 9 Catalytically Active against Fibronectin. **Prot. Expr. and Pur.**v.21 p.65-70, 2001.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S., COMINETTI, M.R., TERRUGGI, C.H.B., *et al* Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates  $\alpha_2\beta_1$  integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Braz. Jour. Of Med. And Biol. Reser.**, v. 38, p. 1505-1511, 2005.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S., SOUZA, E.L.D., BELTRAMINI, L.M. *et al* Expression, Refolding, and Activity of a Recombinant Nonhemorrhagic Snake Venom Metalloprotease. **Prot. Expr. And Pur.** V.19, p. 41-47, 2000.

SHAPIRO, S.D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. **Curr. Opin.in Cell Biol.** v. 10, p. 602-608, 1998.

SMITH, J.B., THEAKTSTON,R.D.G.,COELHO,A.L.J., *et al.* Characterization of a monomeric disintegrin, ocellatusin, present in the venom of the Nigerian carpet viper, *Echis ocellatusin*. **FEBS Lett.**, v.512, p.111-115, 2002.

SOUZA, D. H.; IEMMA, M. R.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, R. B. et al. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 384, n. 2, p. 341-350, 2000.

STRÖMBLAD, S., CHERESH, D. Cell adhesion and angiogenesis. **Trends in Cell Biol.** v.6, p. 462-467, 1996.

SURÁZYŃSKI, A., SIENKIEWICZ, P., WOLCZYŃSKI, S., PALKA, J. Differential effects of echistatina in human dermal fibroblasts and their possible implication in  $\beta$ 1-integrin mediated signaling. **Pharmac.Reser**, v.51, p. 217-221, 2005.

TANJONI, I., BUTERA, D., BENTO, L. *et al.* Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**. V. 42, p. 801-808, 2003.

TEIXEIRA, C.DE F., FERNANDEZ, C.M., ZULIANI, J.P., ZAMUNER, S.F.Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 100, p.181-184, 2005.

TERRUGGI, C.H.B. **Estudos do efeito da Alternagina-C, uma desintegrina do veneno de *Bothrops alternatus*, sobre a adesão de células normais e tumorais. Avaliação do seu potencial como agente anti-metastático.** 2004.148p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução).

TREMBLAY,P-L., BERTHOD,F., GERMAIN,L.*et al* In vitro Evaluation of the Angiostatic Potential of Drugs using an Endothelialized Tissue-Engineered Connective Tissue. **The Jour. of Pharmac. And Exp. Thera**, v.315, p.510-516, 2005.

TSELEPIS, V.H., GREEN, L.J., HUMPHRIES, M.J. An RGD to LDV Motif Conversion within the Disintegrin Kistrin Generates an Integrin Antagonist That Retains Potency but Exhibits Altered Receptor Specificity. **The Jour. Of Biol. Chem.** v.272, p.21341-21348, 1997.

VENENO DE COBRA É BASE PARA REMÉDIO ANTICÂNCER. Acesso 07 /09/ 2006  
<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/busca/buscar.cfm>  
<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias>

WANG, J. H.; WU, Y.; REN, F.; LU, L.;ZHAO, B. C. Cloning and characterization of Adinbitor, a novel disintegrin from the snake venom of *Agkistrodon halys breviceaudus* stejneger. **Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai)**, v. 36, n. 6, p. 425-429, 2004.

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

WOLFSBERG,T.G., PRIMAKOFFJ,P., MYLES,D.G., WHITE,J.M. ADAM, a Novel family of membrane proteins containing A disintegrin\_ And Metalloprotease Domain: Multipotential functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. **Jour.Cell.Biol**,v131, p275-278 1995.



WU, W-B., PENG, H-C., HUANG, T-F Disintegrin causes proteolysis of catenin and apoptosis of endothelial cells. Involvement of cell-cell and cell-ECM interactions in regulating cell viability. **Exp.Cell Reser**, v.286, p.115-127, 2003.

YAMADA, K.M Adhesive recognition sequences. **Jour. Biol.Chem.**,v.266, p. 12809-12812, 1991.

YANG, R-S., TANG, C-H., CHUANG, W-J., *et al* Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, v.45, p.661-669, 2005.

YEH, C-H., PENG, H-C., YANG, R-S, HUANG, T-F. Rhodostomin, A Snake Venom Disintegrin, Inhibits Angiogenesis Elicited by Basic Fibroblast Growth Factor and Suppresses Tumor Growth by a Selective  $\alpha_v\beta_3$  Blockade of Endothelial Cells. **Mol.Pharm.** v.59, p. 1333-1342, 2001.

ZHOU, Q.; HU, P.; RITTER, M. R.; SWENSON, S. D.; ARGOUNOVA, S.; EPSTEIN, A. L. *et al*. Molecular cloning and functional expression of contortrostatin, a homodimeric disintegrin from southern copperhead snake venom. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 375, n. 2, p. 278-288, 2000.

ZHOU, Q.; NAKADA, M. T.; ARNOLD, C.; SHIEH, K. Y.;MARKLAND, F. S., Jr. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from Agkistrodon contortrix contortrix, inhibits angiogenesis. **Angiogenesis.**, v. 3, n. 3, p. 259-269, 1999.

ZHOU, Q.; NAKADA, M. T.; BROOKS, P. C.; SWENSON, S. D.; RITTER, M. R.; ARGOUNOVA, S. *et al*. Contortrostatin, a homodimeric disintegrin, binds to integrin  $\alpha_v\beta_5$ . **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, v. 267, n. 1, p. 350-355, 2000.

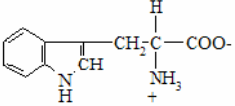
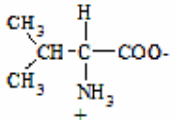
ZHOU, X-D., DING, C-H, TAI, H. *et al* A novel disintegrin, jerdonatin, inhibits platelet aggregation and sperm-egg binding. **Comp. Biochem. And Phys.** v. 139, p. 117-122, 2004.

## APÊNDICE 1

## NOMENCLATURA DOS AMINOÁCIDOS

Nome	Símbolo de 3 Letras	Símbolo de 1 Letra	Estrutura
Alanina	Ala	A	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{CH}_3\text{-C-COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Arginina	Arg	R	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{C}-\text{COO}^- \\    \quad   \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
Asparagina	Asn	N	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}=\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Ácido Aspártico	Asp	D	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\   \\ \text{C}=\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Ácido Glutâmico	Glu	E	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\   \\ \text{C}=\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Cisteína	Cys	C	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Fenilalanina	Phe	F	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Glicina	Gly	G	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

<b>Glutamina</b>	<b>Gln</b>	<b>Q</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{H} \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
<b>Histidina</b>	<b>His</b>	<b>H</b>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{HC}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \quad   \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH} \\   \\ \text{H} \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
<b>Isoleucina</b>	<b>Ile</b>	<b>I</b>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
<b>Leucina</b>	<b>Leu</b>	<b>L</b>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
<b>Lisina</b>	<b>Lys</b>	<b>K</b>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ ^+\text{NH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
<b>Metionina</b>	<b>Met</b>	<b>M</b>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
<b>Prolina</b>	<b>Pro</b>	<b>P</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{COO}^- \\   \quad   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{N}^+-\text{H} \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$
<b>Serina</b>	<b>Ser</b>	<b>S</b>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
<b>Tirosina</b>	<b>Tyr</b>	<b>Y</b>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
<b>Treonina</b>	<b>Thr</b>	<b>T</b>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$

<b>Triptofano</b>	<b>Trp</b>	<b>W</b>	 <p>The chemical structure of Tryptophan shows an indole ring system attached to a methylene group (-CH<sub>2</sub>-), which is then attached to an alpha-carbon. The alpha-carbon is bonded to a hydrogen atom (H) above it, a carboxylate group (-COO-) to its right, and a protonated amino group (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) below it.</p>
<b>Valina</b>	<b>Val</b>	<b>V</b>	 <p>The chemical structure of Valine shows a central alpha-carbon bonded to a hydrogen atom (H) above it, a carboxylate group (-COO-) to its right, and a protonated amino group (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) below it. The alpha-carbon is also bonded to a beta-carbon, which is bonded to two methyl groups (-CH<sub>3</sub>) on either side.</p>