

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

**EFEITOS DE UMA DESINTEGRINA RECOMBINANTE DE *Bothrops alternatus*,  
DISBA-01, EM CÉLULAS PRECURSORAS MIOGÊNICAS (CPM)**

**Ana Carolina Elias Pedretti**

**SÃO CARLOS  
2009**

**EFEITOS DE UMA DESINTEGRINA RECOMBINANTE DE *Bothrops alternatus*,  
DISBA-01, EM CÉLULAS PRECURSORAS MIOGÊNICAS (CPM)**

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

**EFEITOS DE UMA DESINTEGRINA RECOMBINANTE DE *Bothrops alternatus*,  
DISBA-01, EM CÉLULAS PRECURSORAS MIOGÊNICAS (CPM)**

**Ana Carolina Elias Pedretti**

**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  
2009**

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

P371eu

Pedretti, Ana Carolina Elias.

Efeitos de uma desintegrina recombinante de *Bothrops alternatus*, DISBA-01, em células precursoras miogênicas (CPM) / Ana Carolina Elias Pedretti. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

94 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Biologia molecular. 2. Células precursoras miogênicas. 3. DisBa-01. 4. Integrinas. I. Título.

CDD: 574.88 (20ª)

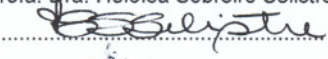
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

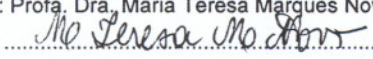
EFEITOS DE UMA DESINTEGRINA RECOMBINANTE DE BOTHROPS  
ALTERNATUS, DISBA-01, EM CÉLULAS PRECURSORAS MIOGÊNICAS (CPM)

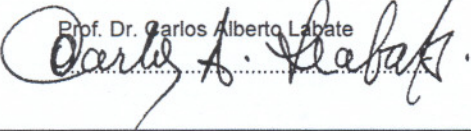
Ana Carolina Elias Pedretti

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

Submetida à defesa pública no dia , tendo sido aprovada.

Presidente: Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo  


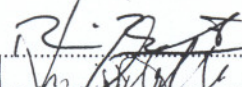
Membros: Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo  


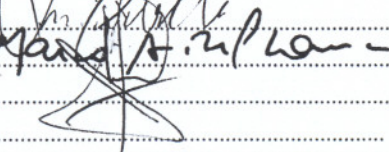
Prof. Dr. Carlos Alberto Labate  


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 230 Reunião Ordinária da CPG,  
em 07/10/09.

Presidente: 

Membros: 

SÃO CARLOS – SP  
2009

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Valeria e José, que sempre me incentivaram e  
apoiaram minhas decisões.

## **Agradecimentos**

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, pela orientação durante o desenvolvimento do trabalho e pela oportunidade ao me aceitar como aluna.

Aos meus pais, que me incentivaram nos estudos e na carreira acadêmica, me “paitrocinando” sempre que necessário, me apoiando em todos os momentos da minha vida e respeitando as minhas decisões, fossem elas acertadas ou não.

À Sabrina de Oliveira, que me incentivou e apoiou, além de me aguentar durante meus períodos de estresse e me amar incondicionalmente.

Aos meus irmãos que, apesar de não entenderem bem o que eu faço, entenderam a minha ausência.

Aos meus amigos Ana Carolina “Florette”, Karine “Pi”, Diogo “Kane”, Franklin “Kin”, Rodrigo “Nodles”, Laís “Vör”, Paulo “Metta”, Pedro “Jo”, Pedro “Aykes”, Fernando “Sancho”, Roberto “Zanzar”, Valter “pai babão”, Gustavo “Guto”, Renato “Nato”, Felipe “Lipe”, Wagner “Uoorshi”, Marcus “Maruh”, Thiago “Batata”, Felipe “Assis”, Marina “Lóderr”, Brian “Kairi”, Virgínia “Sayuri” e Márlio “Bed” (o menino-gênio mais fofo que eu já vi), que, mesmo distantes, me distraíram, divertiram e animaram. Poucas pessoas me fazem rir tanto quanto vocês.

Ao meu amigo Guilherme Trevizoli Salomão, que me aguenta há quase 10 anos.

Às minhas amigas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Carmen, Carol, Juliana, Kelli, Sílvia, Cyntia, Lívia, Patty, Araceli, Verônica, Daíse e Natália.

À Sheila, da USP, pela paciência e boa vontade ao me ensinar a mexer com géis 2D.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate por todo o apoio e boa vontade em me auxiliar.

À Rede de Proteoma do Estado de São Paulo, FAPESP, FINEP e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram durante este período da minha vida.

“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de compreender mais,  
para temer menos.” – Marie Curie



## Resumo

Desintegrinas são toxinas frequentemente encontradas em venenos de serpentes e cujos efeitos biológicos ocorrem devido à interação com receptores de superfície conhecidos como integrinas. A DisBa-01, uma desintegrina RGD isolada de mRNAs da glândula venenífera de *Bothrops alternatus*, possui atividade anti-metastática, anti-angiogênica e anti-trombótica em camundongos atímicos, parcialmente mediada pela interação com a integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Estudos *in vivo* com ratos Wistar também indicam que esta proteína pode ter atividade pró-angiogênica durante regeneração pós-cirúrgica. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da DisBa-01 na adesão, desadesão e proliferação celular de mioblastos C2C12, além de avaliar o perfil eletroforético das proteínas secretadas por estas células sob condições normais e tratadas. As células ( $10^3$  células/poço) foram incubadas com diferentes concentrações de DisBa-01 em diferentes tempos e substratos (plástico, colágeno tipo I e fibronectina). O meio de cultura foi recolhido para análise por eletroforese bidimensional (2DE) e as células foram quantificadas. Além disso, foi realizada citometria de fluxo para avaliar a expressão de integrinas ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_4$ ). A DisBa-01 inibiu a adesão das células à fibronectina em alta concentração (1000nM), além de inibir a adesão das células ao colágeno em todas as concentrações testadas, mas não promoveu a desadesão de células aderidas a estes dois substratos tampouco afetou significativamente a proliferação de mioblastos. A análise por citometria de fluxo identificou as integrinas  $\alpha_v$  e  $\beta_1$ , corroborando em parte os resultados obtidos. A análise por 2DE do sobrenadante indicou que a DisBa-01 induz a um aumento no número de proteínas secretadas, principalmente na maior concentração testada (1000nM). Em conclusão, os mioblastos C2C12 são sensíveis à DisBa-01, sugerindo que esta proteína inicia uma cascata de sinalização celular mediada por integrinas que modifica a secreção protéica.

**Palavras-chave:** C2C12, células precursoras miogênicas, DisBa-01, integrinas

### Abstract

Disintegrins are toxins commonly found in snake venoms whose biological effects occur upon interaction with surface receptors known as integrins. DisBa-01, an RGD disintegrin isolated from a cDNA library made with mRNAs from the venom gland of *Bothrops alternatus*, bears anti-metastatic, anti-angiogenic and anti-thrombotic activity in nude mice, partially mediated by interaction with integrin  $\alpha_v\beta_3$ . Studies with Wistar rats also show that protein has angiogenic activity during regeneration after surgery. The objectives of this study were to evaluate the effects of DisBa-01 on adhesion, deadhesion and proliferation of C2C12 myoblasts and evaluate the electrophoretic profile of secreted proteins of DisBa-01-treated cells. Myoblasts ( $10^3$  cells/well) were incubated with five concentrations of DisBa-01 under different incubation times and adhesion substrates (plastic, collagen type I or fibronectin). The supernatant was collected for 2DE analysis and the cells were quantified. Also, flow cytometry was used to evaluate the expression of integrins ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\beta_1$  and  $\beta_4$ ). DisBa-01 inhibited adhesion to fibronectin in high concentration (1000nM) and to collagen type I in all tested concentrations, but did not detach cells from collagen or fibronectina matrix nor affected myoblast proliferation. Flow cytometry showed that integrins  $\alpha_v$  and  $\beta_1$  were present. 2DE analysis points to an increase of secreted proteins, mainly in higher DisBa-01 concentration (1000nM). In conclusion, C2C12 myoblasts are sensitive to DisBa-01, suggesting this protein initiates a sinalization cascade mediated by integrins, which modifies protein expression and secretion.

**Keywords:** C2C12, myogenic precursor cells, DisBa-01, integrins

## Lista de Figuras

Figura 1: Cascata de coagulação.....	7
Figura 2: Diagrama esquemático das classes de metalopeptidases de veneno de serpentes (SVMPs).....	13
Figura 3: Receptores de adesão celular.....	22
Figura 4: Representação da associação das subunidades $\alpha$ e $\beta$ de integrinas de mamíferos.....	24
Figura 5: Diagrama da família de integrinas.....	27
Figura 6: Localização das células satélite.....	31
Figura 7: Fibra muscular em processo de regeneração.....	33
Figura 8: Morfologia dos mioblastos durante os ensaios.....	51
Figura 9: Adesão de mioblastos a placas de cultura recobertas com diferentes proteínas.....	52
Figura 10: Porcentagem de mioblastos aderidos em placas recobertas com colágeno tipo I.....	54
Figura 11: Porcentagem de mioblastos aderidos em placas recobertas com fibronectina.....	54
Figura 12: Porcentagem de mioblastos aderidos ao colágeno tipo I após incubação com DisBa-01.....	56
Figura 13: Porcentagem de mioblastos aderidos à fibronectina após incubação com DisBa-01.....	56
Figura 14: Proliferação de mioblastos na presença de DisBa-01 em diferentes concentrações após incubação.....	58
Figura 15: Histogramas das análises de células desaderidas das garrafas de cultura com EDTA ou tripsina.....	60
Figura 16: Histogramas das análises de células C2C12 incubadas com diferentes integrinas.....	62
Figura 17: Eletroforese bidimensional.....	64

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Comparação entre os géis controle (sem adição de DisBa-01) e tratados com diferentes concentrações de DisBa-01 após 24h de incubação.....	64
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Lista de Abreviaturas e Siglas

**2DE:** eletroforese bidimensional

**ADP:** adenosina difosfato

**ALT-C:** desintegrina Alternagina-C

**BCA:** ácido bicinrônico

**BMP:** proteína morfogenética óssea

**BSA:** soroalbumina bovina

**Ca<sup>2+</sup>:** íon cálcio

**cDNA:** ácido desoxirribonucléico complementar

**Co<sup>2+</sup>:** íon Cobalto

**CPM:** célula precursora miogênica

**Cu<sup>2+</sup>:** íon Cobre

**DDR:** receptor de domínio discoidina

**DisBa-01:** desintegrina de *Bothrops alternatus*

**DMEM:** meio Dulbecco's modificado acrescido de nutrientes

**DNA:** ácido desoxirribonucléico

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético

**EPM:** erro padrão da média

**FACS:** citometria de fluxo

**Fe<sup>2+</sup>:** íon ferroso

**FGF-1:** fator de crescimento de fibroblasto 1

**FITC:** isotiocianato de fluoresceína

**HUVEC:** célula endotelial vascular umbilical humana

**IGF-1:** fator de crescimento tipo insulina 1

**Ig:** imunoglobulina

**IgG:** imunoglobulina G

**IL-1:** interleucina-1

**IPG:** gel com gradiente de pH imobilizado

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

**K<sup>+</sup>:** íon Potássio

**LAIR:** receptor tipo Ig associado a leucócito

**MAPK:** proteína quinase ativada por mitógeno

**MEC:** matriz extracelular

**Mg<sup>2+</sup>:** íon Magnésio

**MMP:** metalopeptidase de matriz

**MP:** metalopeptidase

**mRNA:** ácido ribonucléico mensageiro

**MSC:** célula tronco mesenquimal

**Myf5:** fator miogênico 5

**MyoD:** fator miogênico D

**Na<sup>+</sup>:** íon Sódio

**NCAM:** molécula de adesão de célula neural

**P:** Fósforo

**PBS:** tampão salina fosfato

**PDGF:** fator de crescimento derivado de plaquetas

**pH:** potencial hidrogeniônico

**pI:** ponto isoelétrico

**PLA<sub>2</sub>:** fosfolipase A<sub>2</sub>

**RNA:** ácido ribonucléico

**RPM:** rotações por minuto

**SDS:** duodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

**SE:** solução de equilíbrio

**SFB:** soro fetal bovino

**SVMP:** metalopeptidase de veneno de serpente

**SVTLE:** enzima tipo trombina de veneno de serpente

**TGF $\beta$ 1:** fator de crescimento tumoral  $\beta$ 1

**TR:** tampão de reidratação

**VCAM:** molécula de adesão de célula vascular

**VEGF:** fator de crescimento endotelial

**Zn<sup>2+</sup>:** íon Zinco

## Sumário

Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas .....	x
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Composição de venenos .....	5
1.2 Metalopeptidases .....	9
1.3 Metalopeptidases de veneno de serpente (SVMPs).....	11
1.4 Desintegrinas .....	15
1.4.1 DisBa-01 .....	20
1.5 Integrinas .....	21
1.6 Células tronco .....	28
1.6.1 Células precursoras miogênicas .....	30
1.6.2 C2C12.....	36
1.7 Proteoma.....	37
2. OBJETIVOS.....	40
3. METODOLOGIA.....	41
3.1 Expressão da DisBa-01.....	41
3.2 Dosagem de proteínas.....	42
3.3 Células precursoras miogênicas (CPM).....	43
3.4 Ensaios celulares .....	43
3.4.1 Ensaio de promoção de adesão.....	43
3.4.2 Ensaio de desadesão ou descolamento.....	44
3.4.3 Ensaio de inibição de adesão.....	45
3.4.4 Ensaio de proliferação celular .....	46
3.4.5 Método colorimétrico (cristal violeta) .....	46
3.5 Determinação dos receptores de adesão por citometria de fluxo .....	47
3.6 Eletroforese bidimensional .....	48
3.7 Análise estatística dos dados.....	49
4. RESULTADOS .....	50
4.1 Ensaios celulares .....	50
4.1.1 Ensaio de promoção de adesão.....	52



4.1.2 Ensaio de desadesão .....	53
4.1.3 Ensaio de inibição da adesão.....	55
4.1.4 Ensaio de proliferação celular .....	57
4.3 Determinação dos receptores de adesão por citometria de fluxo .....	58
4.4 Eletroforese bidimensional .....	63
5. DISCUSSÃO .....	66
6. CONCLUSÕES .....	74

## 1. INTRODUÇÃO

As serpentes (do latim *serpens*, *serpentis* – que rasteja ou rastejante) são animais vertebrados, membros da classe dos répteis com o maior sucesso de radiação existente tanto em número de espécies quanto em distribuição geográfica (Keogh *et al.*, 1998; Cadle e Biesecker, 1987). Figura recorrente no imaginário da humanidade, a serpente é encontrada em contos, histórias e mitologias de diversos povos ao longo da História, sendo a representação tanto de morte, maleficências e engodos quanto de renovação, regeneração, imortalidade, por sua capacidade de troca de pele (muda), e sabedoria. Atualmente, diversos símbolos envolvendo serpentes são utilizados: o símbolo da Medicina é representado por uma única serpente envolvendo o cetro de Esculápio, deus grego da cura; a serpente enrolada em um cálice é o símbolo da Farmácia; um cetro envolvido por duas serpentes é o símbolo das Ciências Contábeis, representando o caduceu de Mercúrio.

As serpentes possuem o corpo alongado, sem membros e recoberto de escamas córneas, que são importantes para sua identificação e classificação. A camada superficial desta cobertura é trocada periodicamente. São animais ectotérmicos, sem controle sobre a temperatura corporal que está sempre próxima à temperatura ambiente. Seus 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, possibilitando os movimentos característicos das cobras (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Centro de Conservação de Répteis e Anfíbios, 2009).

As serpentes podem ser classificadas em dois grupos: as peçonhentas, com aparato inoculador de veneno, e as não peçonhentas ou constritoras. Ambos os grupos são

encontrados no Brasil, em diversos habitats, incluindo ambientes urbanos. De cerca de 250 espécies de serpentes existentes no país, 70 são peçonhentas (Pinho e Pereira, 2001) e pertencem aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (Melgarejo, 2003). Em 2008, foram notificados 26.252 casos de acidentes com serpentes peçonhentas, dos quais 19.285 (73,5%) foram causados por serpentes do gênero *Bothrops* (Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2008).

Os acidentes ofídicos representam a maior parte dos acidentes com animais peçonhentos no Brasil, ocorrendo em todos os estados do país. O maior número de casos ocorre na região norte, mas há grande número de acidentes nas regiões sudeste e centro-oeste também. Além disso, o número de casos é maior nos meses quentes e chuvosos, quando a atividade humana nos campos aumenta (Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2008).

Há cerca de 2700 espécies de serpentes descritas, das quais apenas um quinto é venenoso ou peçonhento. Serpentes peçonhentas estão distribuídas em quatro famílias: Viperidae, Atractaspididae, Elapidae e Colubridae (Fox e Serrano, 2008a).

Os critérios para a divisão das serpentes em peçonhentas e não peçonhentas são: a presença ou ausência da fosseta loreal, o tipo de cauda e o tipo de dentição, além do padrão de cores que distinguem as serpentes do gênero *Micrurus* (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Centro de Conservação de Répteis e Anfíbios, 2009).

A fosseta loreal é uma membrana rica em terminações nervosas ligadas ao cérebro, presente somente em serpentes peçonhentas. Localizado entre as narinas e os olhos, este sensor térmico permite que a serpente perceba variações térmicas mínimas, na ordem de 0,003°C. As serpentes do gênero *Micrurus* (coral-verdadeira) são uma exceção, por não

possuírem fosseta loreal. Estas serpentes são distinguidas pelo padrão de anéis coloridos (brancos, pretos e vermelhos) em seu corpo (Instituto Butantan, 2009).

Dentre as serpentes com fosseta loreal, as que possuem cauda lisa são as do gênero *Bothrops*, as com caudas com escamas arrepiadas são do gênero *Lachesis* e as com chocalho na cauda são do gênero *Crotalus* (Fundação Nacional de Saúde, 2001).

A dentição das serpentes pode ser de quatro tipos distintos: áglifa, opistóglifa, proteróglifa e solenóglifa. As duas primeiras são encontradas em serpentes não peçonhentas, enquanto as duas últimas são características de serpentes peçonhentas. As serpentes com dentição áglifa possuem dentes pequenos e maciços; as com dentição opistóglifa, além de dentes pequenos e maciços, possuem um par de dentes mais longos com sulcos por onde a saliva pode escorrer. Serpentes com dentição proteróglifa possuem, além dos dentes pequenos e maciços, um par de dentes dianteiros semi-caniculados cujo tamanho pouco difere dos outros e que injeta o veneno; serpentes com dentição solenóglifa possuem um par de dentes dianteiros caniculados, maiores que os outros dentes, capazes de se movimentarem para frente no momento do bote e injetar o veneno (Instituto Butantan, 2009).

No Brasil, existem serpentes peçonhentas de três famílias: Viperidae, Elapidae e Colubridae.

A família Viperidae é representada pelos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. Com cerca de 30 espécies de serpentes distribuídas pelo território nacional, as *Bothrops* são popularmente conhecidas como urutu-cruzeiro, jararaca e jararacuçu, e habitam ambientes úmidos, áreas cultivadas e regiões com abundância de roedores. O gênero *Crotalus* abriga várias espécies, como a cascavel, que geralmente habitam áreas secas, arenosas e campos abertos. Elas não

são agressivas e raramente atacam; sua principal característica é o guizo na cauda (Fundação Nacional de Saúde, 2001).

As corais, do gênero *Micrurus*, pertencem à família Elapidae. São animais de pequeno e médio porte, com anéis vermelhos, pretos e brancos em qualquer combinação. A família Colubridae é representada pelos gêneros *Clelia* e *Philodryas* (muçuranas e cobras verdes, respectivamente), cuja dentição opistóglifa dificulta a inoculação do veneno nas presas (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Centro de Conservação de Répteis e Anfíbios, 2009; Fundação Nacional de Saúde, 2001).

A mordida de serpentes é uma ameaça presente em muitas comunidades, seja em nações subdesenvolvidas ou em nações desenvolvidas. Apesar dos antivenenos reduzirem a mortalidade, a sua produção é baixa. Assim, o entendimento dos componentes dos venenos, por meio de estudos bioquímicos, farmacológicos e moleculares, é de grande importância para a otimização de agentes terapêuticos. Juntamente com os antivenenos, as pesquisas com venenos de serpentes têm grande potencial para a descoberta de novas drogas terapêuticas, pois muitas proteínas que compõe esses venenos possuem poderosas atividades terapêuticas como indução da fibrinólise e inibição da agregação plaquetária, entre outras (Cheng *et al.*, 2002).

Uma grande quantidade de informações sobre os componentes e mecanismos de ação dos venenos de serpente está disponível atualmente; a maior parte dos artigos publicados em revistas específicas de toxinologia está relacionada a venenos de serpente e seus componentes (Guimaraes *et al.*, 2004).

Estes estudos atraíram também a atenção comercial, com a possibilidade de desenvolvimento de fármacos a partir de componentes do veneno de serpentes. O primeiro

medicamento desenvolvido a partir do veneno de uma serpente foi o Captopril (Squibb), inibidor da enzima conversora da angiotensina derivado do veneno de *Bothrops jararaca*, em 1975. Outro exemplo é o medicamento Aggrastat (Merck), anticoagulante cujo protótipo foi a desintegrina derivada de veneno de serpente echistatina (Koh *et al.*, 2006; Ramos e Selistre-de-Araujo, 2006).

### 1.1 Composição de venenos

O veneno das serpentes é produzido e armazenado em glândulas de veneno e utilizado primariamente para o ataque, contendo componentes que imobilizam e facilitam a digestão da presa (Menezes *et al.*, 2006; Karalliedde, 1995).

Os efeitos dos venenos de serpentes são complexos, primeiramente devido à diversidade de componentes, com ações distintas, e também pela interação destes componentes entre si, potencializando a atividade do veneno. Em sua maioria, os venenos são formados por uma complexa mistura de peptídeos com diferentes ações farmacológicas. Esta diversidade faz com que os peptídeos de venenos sejam uma fonte a partir da qual é possível propor e moldar estruturalmente novos agentes terapêuticos (Lewis e Garcia, 2003).

Além de peptídeos, os venenos de serpentes possuem em sua composição outros componentes orgânicos, além de componentes inorgânicos. Os componentes inorgânicos incluem  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{P}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Nem todos estes íons são encontrados em todos os tipos de venenos e sua quantidade varia conforme a espécie de serpente. O papel biológico destes íons ainda não é totalmente claro, mas sabe-se que alguns deles, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , são importantes para a estabilização de algumas proteínas dos

venenos, enquanto outros, como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , participam do mecanismo catalítico de alguns componentes dos venenos, como as metalopeptidases. Os componentes orgânicos podem ser separados em componentes protéicos e não protéicos, sendo que os primeiros respondem pela maior parte dos componentes (Bjarnason e Fox, 1994).

Mais de 95% do peso seco da maioria dos venenos são polipeptídeos que incluem enzimas, toxinas e pequenos peptídeos, capazes de modificar a resposta fisiológica do animal envenenado (Karalliedde, 1995). Os componentes não protéicos incluem carboidratos (glicoproteínas), lipídeos (principalmente fosfolipídeos), aminas biogênicas (abundantes em venenos de Viperidae e Crotalidae), nucleotídeos e aminoácidos (Souza *et al.*, 2000; Bjarnason e Fox, 1994).

Há uma diversidade de efeitos após o envenenamento por serpentes em humanos. Entretanto, apenas poucas categorias têm significância clínica, como a paralisia flácida, miólise sistêmica, cardiopatia, cardiotoxicidade, falência renal, hemorragia e dano tecidual no local da mordida, e cada uma delas pode causar inúmeros efeitos secundários, com diferentes potenciais de morbidade e mortalidade. O veneno de qualquer espécie de serpente pode mostrar atividade em uma ou mais categorias, mas raramente em todas (White, 2005).

A cascata de coagulação (figura 1) é um dos alvos das toxinas de venenos de serpente (Amara *et al.*, 2008). As toxinas de venenos que afetam a hemostase podem ser classificadas de acordo com seu efeito geral: coagulantes (enzimas tipo trombina e toxinas ativadoras de protrombina), anticoagulantes, fosfolipases A, ativadoras de plaquetas, antiplaquetárias, fibrinolíticas e hemorraginas (metalopeptidases) (Gay *et al.*, 2005; Marsh e Williams, 2005).

Cerca de 100 toxinas de venenos de serpentes foram descritas como tipo trombina, amplamente distribuídas em vários gêneros das famílias Viperidae e Colubridae (Lu *et al.*,

2005). Apesar de algumas ações destas enzimas tipo trombina de venenos de serpentes (SVTLEs) lembrarem os efeitos da trombina, este grupo não realiza a clivagem dos fibrinopeptídeos A e B do fibrinogênio, tampouco é capaz de ativar o fator XIII, fazendo com que coágulos criados *in vitro* sejam friáveis e facilmente dissolvidos (Marsh e Williams, 2005).

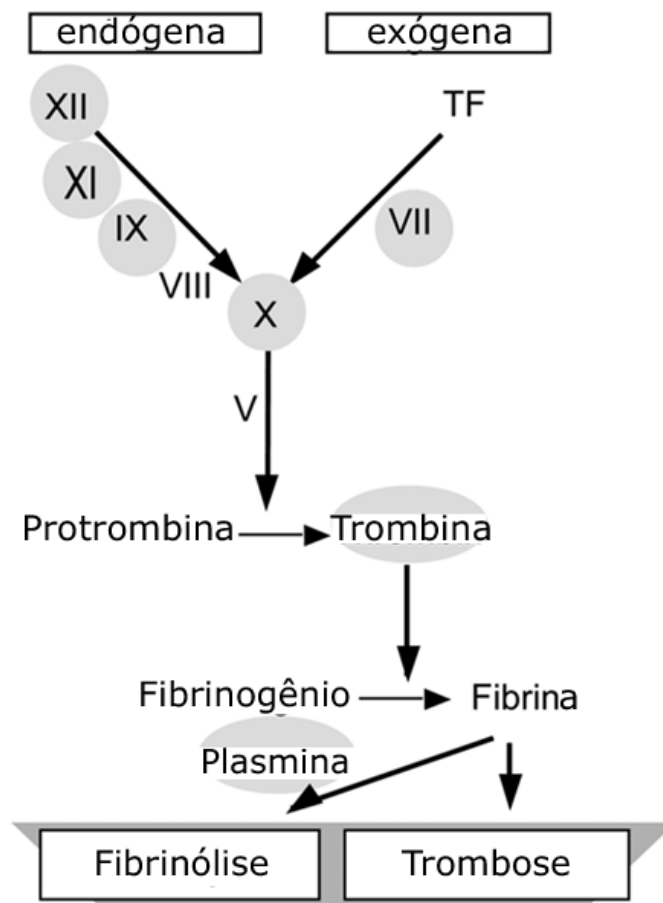


Figura 1: Cascata de coagulação.

Retirado e adaptado de Amara *et al.*, 2008.

Muitos dos venenos de serpentes contêm ativadores de protrombina, que convertem protrombina em trombina e meizotrombina. Eles são divididos em quatro grupos, de acordo com suas estruturas, características funcionais e co-fatores requeridos: grupos A, B, C e D.



O grupo A, encontrado em diversos gêneros da família Viperidae, concentra os ativadores de protrombina sem cofatores. O grupo B é cálcio-dependente, com duas subunidades ligadas não covalentemente: uma metalopeptidase e uma lectina tipo C ligadas por pontes dissulfeto. O grupo C, encontrado somente em alguns gêneros australianos da família Elapidae, é formado por serinoproteases que precisam de cálcio e fosfolipídios para ativação. O grupo D também é formado por serinoproteases dependentes de cálcio, vesículas de fosfolipídios carregados negativamente e do fator Va da cascata de coagulação plasmática. Algumas enzimas ativadoras de protrombina são estrutural e funcionalmente homólogas a fatores de coagulação (Lu *et al.*, 2005; Marsh e Williams, 2005).

A proteína C, dependente de vitamina K, é um anticoagulante que participa do controle da hemostase. A maioria dos ativadores de proteína C tem sequências altamente similares a outras serinoproteases de venenos (Lu *et al.*, 2005; Marsh e Williams, 2005).

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) de venenos de serpentes formam um grupo de proteínas diversas que afetam a hemostase, com ampla variedade de efeitos farmacológicos (como atividade anticoagulante, devido a sua competição com fatores de coagulação pela ligação a fosfolipídios) e que podem ser divididas em dois grupos: PLA<sub>2</sub> Asp 49, com grande capacidade catalítica, e PLA<sub>2</sub> Lys 49, com baixa ou nenhuma atividade catalítica. O resíduo Asp 49 é essencial para a atividade catalítica, sendo parte do sítio de ligação ao cálcio (Lu *et al.*, 2005; Marsh e Williams, 2005).

As metalopeptidases, presentes nos venenos das famílias Viperidae e Crotalidae, degradam a matriz extracelular (MEC) de vasos sanguíneos, afetando a hemostase (Lu *et al.*, 2005; Marsh e Williams, 2005) e causando hemorragia local e sistêmica, principalmente em ataques por membros da família Viperidae (Gutierrez *et al.*, 2006). As metalopeptidases

também têm efeito citotóxico em células endoteliais e agem em componentes do sistema hemostático (de Roodt *et al.*, 2003).

## 1.2 Metalopeptidases

Diversos processos que ocorrem durante o remodelamento de tecidos são dependentes da proteólise da MEC, tanto em condições fisiológicas normais quanto em patologias. Essa proteólise geralmente é realizada por proteases que também podem processar proteínas de adesão e outros receptores de superfície celular (Chang e Werb, 2001; Naglich *et al.*, 2001). Membros da superfamília das Zinco-metalopeptidases (zincinas) estão envolvidos nestes processos. As zincinas são classificadas em cinco famílias de proteínas de acordo com as sequências ao redor do motivo HEXXH: astacina, matrixina, reprotisina, termolisina e serratia. Além desta superfamília, há ainda a superfamília das Inverzincinas, a das Carboxipeptidases e a das DD-Carboxipeptidases, todas com o sítio de ligação ao zinco e um resíduo de histidina como o terceiro ligante a este íon (DeClerck, 2000).

As metalopeptidases da superfamília das Inverzincinas, um grupo pequeno, são caracterizadas pela inversão do motivo de ligação ao zinco (HXXEH), e já foram encontradas em humanos, ratos, abelhas, bactérias e leveduras. A superfamília das Carboxipeptidases é caracterizada por um único motivo de ligação ao zinco, e pode ser dividida em três grupos de acordo com a sequência ao redor do sítio de ligação. O sítio de ligação ao zinco do grupo das DD-Carboxipeptidases é caracterizado pela sequência DHXHV, enquanto a terceira histidina está localizada a 42 resíduos no lado N-terminal do motivo, na sequência SRHMY (DeClerck, 2000).

Parte das zincinas contém duas histidinas e um ácido glutâmico como terceiro ligante de zinco, sendo chamadas gluzincinas. Termolisinas e várias metalopeptidases bacterianas fazem parte deste grupo, com duas regiões conservadas envolvidas na ligação ao zinco. As duas histidinas se encontram na sequência HEXXHXT, enquanto o ácido glutâmico está a 25 resíduos no lado C-terminal, na sequência GXBNEXT (DeClerck, 2000).

Outras zincinas possuem uma sequência consenso de ligação ao zinco mais longa, HEBXHXBGBXH, contendo três histidinas como ligantes de zinco. Adicionalmente, contém uma metionina em uma conformação similar à alça de zinco, chamada *met-turn*, sendo chamadas de metzincinas. As astacinas, matrixinas, reprotinas e serratias fazem parte deste grupo (DeClerck, 2000).

As astacinas, proteínas de diversas origens incluindo metalopeptidases de mamíferos, se caracterizam por um resíduo de ácido glutâmico logo após a terceira histidina. As serratias, proteases extracelulares bacterianas, contêm um resíduo de prolina logo após a terceira histidina ligante de zinco. Tanto nas astacinas quanto nas serratias, há a possibilidade da tirosina presente na região consenso SBMSY da região *met-turn* se ligar ao zinco (DeClerck, 2000).

As metalopeptidases de matriz (MMPs – matrix metalloproteases) pertencem à família das Matrixinas e são capazes de degradar vários componentes da MEC, incluindo colágeno fibrilar (Elkington e Friedland, 2006; Curran e Murray, 2000). As MMPs são secretadas, em sua maioria, em forma solúvel no ambiente extracelular, onde são ativadas, mas há MMPs que podem se localizar na superfície celular, por meio de domínio transmembrana ou interação do tipo ligante-receptor. Em sua forma ativa as MMPs clivam preferencialmente componentes da MEC, mas podem clivar outras proteínas (DeClerck, 2000).

Pertencentes à superfamília das zincinas, as metalopeptidases de veneno de serpente (SVMPs – *Snake Venom Metalloproteases*) são uma das famílias de proteínas de venenos de serpentes que afetam a hemostase (Koh *et al.*, 2006) e podem representar até cerca de 50% das proteínas encontradas no veneno (Fox e Serrano, 2008a).

### 1.3 Metalopeptidases de veneno de serpente (SVMPs)

As metalopeptidases de veneno de serpente (SVMPs) são grandes proteínas que podem ter diversos domínios (Souza *et al.*, 2000), podem ser hemorrágicas ou não hemorrágicas (Kishimoto e Takahashi, 2002; Maruyama *et al.*, 2002) e são fibrino(geno)líticas, clivando preferencialmente a cadeia A $\alpha$  do fibrinogênio, mas também são capazes de clivar a cadeia B $\beta$ . São sintetizadas na glândula de veneno como zimogênios (preproteínas), com um grupo tiol bloqueando o sítio ativo pela ligação ao íon zinco. Após a secreção pela glândula, o grupo tiol é afastado por processamento proteolítico e o zimogênio é convertido na proteína ativa (Matsui *et al.*, 2000).

As SVMPs são classificadas nos grupos P-I, P-II e P-III e vários subgrupos (figura 2), de acordo com a presença ou não de domínios distintos, o processamento proteolítico destes domínios e se há ou não dimerização pós-traducional destes domínios (Fox e Serrano, 2008b; Sant'Ana *et al.*, 2008). Todos os grupos contêm um peptídeo sinal, pró-domínio e domínio catalítico homólogos, além de um peptídeo espaçador. As SVMPs da classe P-I são caracterizadas por possuírem apenas os domínios comuns a todas as SVMPs. As SVMPs da classe P-II contêm um domínio desintegrina adicional, com um motivo RGD dentro de uma alça mantida por pontes dissulfeto, que se liga às integrinas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (receptor de fibrinogênio),

$\alpha_5\beta_1$  (receptor de fibronectina) e  $\alpha_v\beta_3$  (receptor de vitronectina); as SVMPs do grupo P-III possuem um domínio tipo desintegrina, que difere do domínio desintegrina pela substituição do motivo RGD pelo motivo XXCD (quaisquer dois aminoácidos seguidos por Cisteína e Acido Aspártico) e são divididas em quatro subgrupos (Mariano-Oliveira *et al.*, 2003; Ivaska *et al.*, 1999).

O grupo P-II é dividido nos subgrupos P-IIa, P-IIb, P-IIc e P-IIE, enquanto o grupo P-III é dividido nos subgrupos P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc e P-IIId. As SVMPs do subgrupo P-IIa têm um domínio desintegrina adicional que se dissocia da proteína após o processamento da pró-SVMP inativa; as do subgrupo P-IIb têm um domínio metalopeptidase e um domínio desintegrina, que permanecem unidos após o processamento; as do subgrupo P-IIc formam um dímero com os domínios metalopeptidase e desintegrina; as do subgrupo P-IId, cujo produto após o processamento da pró-SVMP não é conhecido, formam desintegrinas homodiméricas; as SVMPs do subgrupo P-IIe, cujo produto após o processamento da pró-SVMP também não é conhecido, formam desintegrinas heterodiméricas. As SVMPs do subgrupo P-IIIa mantêm todos os domínios unidos após o processamento; as do subgrupo P-IIIb têm o domínio metalopeptidase separado dos demais; as do subgrupo P-IIIc formam um dímero com os domínios metalopeptidase, tipo desintegrina e rico em cisteína; as SVMPs do subgrupo P-IIId, além de possuírem os domínios metalopeptidase, tipo desintegrina e rico em cisteína, também apresentam um domínio tipo lectina, ligado por pontes dissulfeto (Fox e Serrano, 2008b).

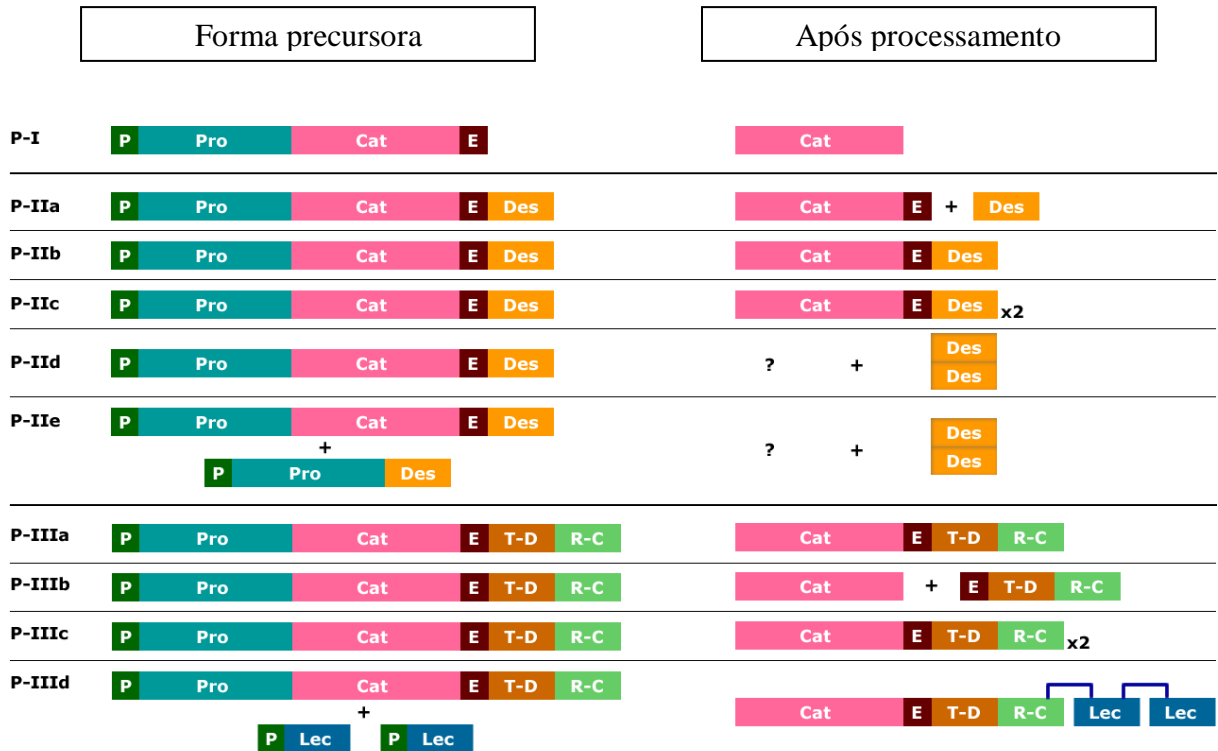


Figura 2: Diagrama esquemático das classes de metalopeptidases de veneno de serpentes (SVMPs).

P: peptídeo sinal; Pro: pró-domínio; Cat: domínio catalítico; E: peptídeo espaçador; Des: domínio desintegrina;

T-D: domínio tipo desintegrina; R-C: domínio rico em cisteína; Lec: domínio tipo lectina. O ponto de interrogação (?) indica que o produto processado não foi identificado no veneno. Extraído e modificado de Fox e

Serrano 2008b.

O peptídeo sinal é composto por dezoito aminoácidos; a maior parte deles são resíduos hidrofóbicos que, funcionalmente, agem como marcador de secreção. O pró-domínio, composto por uma sequência de 200 aminoácidos altamente conservada entre as SVMPs, modula a atividade enzimática por meio de interações com o domínio catalítico. O domínio catalítico, ou metalopeptidase (MP), contém cerca de 215 resíduos de aminoácidos e é menos conservado que o pró-domínio (Ramos e Selistre-de-Araujo, 2006). Este domínio possui de

duas a três pontes dissulfeto, sendo que somente em SVMPs das classes P-II e P-III três pontes dissulfeto são encontradas (Jia *et al.*, 1996; Bjarnason e Fox, 1994).

O peptídeo espaçador, inicialmente, foi descrito como um segmento interdomínio, com 13 a 15 resíduos de comprimento, entre os domínios catalítico e desintegrina. Este segmento, porém, pode ser liberado de alguns precursores ou encontrado em desintegrinas longas, com domínio tipo desintegrina; neste caso, uma cisteína extra forma pontes dissulfeto com o domínio C-terminal e pode estar relacionada à resistência ao processamento proteolítico (Ramos e Selistre-de-Araujo, 2006; Jia *et al.*, 1996; Bjarnason e Fox, 1994).

Os domínios desintegrina e tipo desintegrina variam em comprimento, podendo ter de 41 a 100 resíduos, e em quantidade de pontes dissulfeto. Estudos demonstram que estes domínios são fortes ligantes de integrinas, podendo disparar efeitos biológicos mediados por integrinas. A maior parte das desintegrinas é derivada de precursores da classe P-II e contém o motivo RGD; às derivadas de precursores da classe P-III é dada a nomenclatura de proteínas tipo desintegrina, por conterem sequências alternativas ao motivo RGD, como DCD ou ECD. Além disso, ambos os domínios desintegrina e tipo desintegrina contêm grande número de cisteínas, mas os domínios tipo desintegrina possuem ao menos um resíduo adicional de cisteína em sua estrutura, em relação aos domínios desintegrina (Ramos e Selistre-de-Araujo, 2006; Jia *et al.*, 1996; Bjarnason e Fox, 1994).

O domínio rico em cisteína, assim como o domínio desintegrina, contém grande número de cisteínas e é formado por cerca de 112 resíduos, localizado a C-terminal do domínio desintegrina nas SVMPs do grupo P-III (Ramos e Selistre-de-Araujo, 2006; Jia *et al.*, 1996; Bjarnason e Fox, 1994).

As SVMPS exercem seus efeitos na degradação de proteínas como laminina, fibronectina, proteoglicanas e colágeno tipo IV da membrana basal endotelial, além de agirem sobre proteínas da coagulação sanguínea, causando hemorragias. Também podem aumentar a liberação de citocinas, que induzem a transcrição de MMPs, e inibir a agregação plaquetária. Estes dois fatores estão associados à digestão da MEC de células endoteliais (Ramos e Selistre-de-Araujo, 2006).

Estudos demonstram que a maior parte das desintegrinas conhecidas é liberada de grandes precursores que possuem o domínio metalopeptidase, mas há evidências que sugerem que alguns domínios desintegrina não são separados de seu precursor devido a uma ponte dissulfeto adicional entre uma cisteína na região espaçadora e o domínio desintegrina (Ramos e Selistre-de-Araujo, 2006). Os domínios tipo desintegrina e rico em cisteína das SVMPS de classe P-III podem ser liberados por meio de autoproteólise em condições apropriadas. Isto sugere que alguns produtos da classe P-III podem estar processados no veneno, como a maioria dos produtos de classe P-II (Kishimoto e Takahashi, 2002; Maruyama *et al.*, 2002; Bjarnason e Fox, 1994).

#### **1.4 Desintegrinas**

A integridade dos tecidos, bem como sua função e manutenção, dependem das interações das células com a MEC, realizadas por meio de receptores transmembrana que



estão envolvidos na polimerização da MEC, na ligação mecânica do citoesqueleto e na transdução de sinais entre a MEC e o núcleo (Mayer, 2003). Parte destas interações ocorre por meio do reconhecimento do motivo RGD encontrado em alguns componentes da MEC, como vitronectina, fibronectina e fibrinogênio. Este motivo também é encontrado em alguns grupos de pequenas proteínas ricas em cisteína denominadas desintegrinas, isoladas de venenos de serpentes e conhecidas por invadir a interação célula-MEC e célula-célula mediada por integrinas (Yamada, 1997; Niewiarowski *et al.*, 1994; Gould *et al.*, 1990).

O termo “desintegrina” foi utilizado pela primeira vez em 1989 para descrever um grupo de peptídeos não-enzimáticos ricos em cisteína, de baixa massa molecular (5 a 9 kDa), derivadas do processamento proteolítico de SVMPs, que interagem com integrinas na superfície celular (Gould *et al.*, 1990). Hoje, ao nos referirmos a desintegrinas, estamos nos referindo não só a proteínas presentes em venenos de serpentes, mas também encontradas em ratos, camundongos, bovinos, anfíbios, caranguejos, drosófilas, macacos, leveduras, porcos-da-índia e humanos e que possuem um alinhamento de cisteínas homólogo ao encontrado em proteínas do veneno de serpentes. Uma característica comum de todas as desintegrinas é a capacidade de interagir com receptores de adesão como as integrinas (McLane *et al.*, 2004).

Desintegrinas e proteínas tipo desintegrina solúveis são encontradas no veneno de serpentes da família Viperidae. Estas proteínas podem se ligar a integrinas, sendo capazes de interferir em diversos processos biológicos mediados por integrinas. Algumas desintegrinas possuem atividade inibitória sobre a agregação plaquetária, por meio do bloqueio da glicoproteína IIb/IIIa (integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) da plaqueta, obstruindo a ligação do fibrinogênio ao seu receptor (McLane *et al.*, 1998). Além disso, são capazes de inibir a migração de neutrófilos e sua adesão ao fibrinogênio, além de inibir metástases experimentais (Danen *et al.*, 1998; Trikha *et al.*, 1994). Por outro lado, algumas desintegrinas induzem quimiotaxia por

ativação de integrinas. Portanto o estudo de desintegrinas pode levar ao desenvolvimento de novas drogas antitumorais, antitrombóticas e antiinflamatórias, além de muitas outras aplicações (Shimaoka e Springer, 2003).

A maioria das desintegrinas é caracterizada pelo motivo RGD dentro de uma alça mantida por pontes dissulfeto, que se liga às integrinas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (receptor de fibrinogênio),  $\alpha_5\beta_1$  (receptor de fibronectina) e  $\alpha_v\beta_3$  (receptor de vitronectina), inibindo a agregação plaquetária, interações célula-MEC envolvidas na metástase de células tumorais e angiogênese. Já o domínio tipo desintegrina encontrado nas SVMPs do grupo P-III pode inibir a adesão celular ao colágeno pela ligação à integrina  $\alpha_2\beta_1$  (Souza *et al.*, 2000).

Vários estudos demonstram a capacidade de desintegrinas contendo a sequência RGD de inibir a interação de células tumorais à MEC, por meio de competição específica com receptores de integrinas. A potência da inibição da interação ligante-integrina destas moléculas é, provavelmente, uma função da conformação tanto do motivo RGD quanto dos aminoácidos adjacentes a ele, contribuindo para a especificidade destes peptídeos a diferentes integrinas. Além disso, resíduos não conservados dentro destes peptídeos podem contribuir para a seletividade das integrinas (McLane *et al.*, 1998; Gould *et al.*, 1990).

Algumas desintegrinas são potentes inibidores da angiogênese, por meio da ligação com a integrina  $\alpha_v\beta_3$  e do disparo de eventos apoptóticos em células endoteliais e tumorais. A accutina, de *Agkistrodon acutus* (Yeh *et al.*, 1998), e a salmosina, de *Agkistrodon halys brevicaudus* (Hong *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2000), são exemplos de desintegrinas RGD que possuem tais atividades. As desintegrinas albolabrina, echistatina, ristostatina e barbourina exibiram forte inibição de metástase tumoral de maneira dose-dependente (Beviglia *et al.*, 1995). A contortrostatina (Triखा *et al.*, 1994), além da atividade de inibição da agregação

plaquetária por meio da ligação à integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  das plaquetas, inibe também a adesão de células humanas de melanoma (Tripathi *et al.*, 1994) e células de câncer de cólon (Zhou *et al.*, 2000) à vitronectina, por meio de ligação à integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

A conformação da desintegrina é essencial para sua atividade; o motivo RGD/XCD é encontrado no topo da alça flexível do loop (Cominetti *et al.*, 2004; McLane *et al.*, 2004). A coexistência de desintegrinas RGD com proteínas tipo desintegrina com motivo variável não-RGD na mesma serpente suporta a hipótese de que há duplicação do gene envolvido na pressão de seleção pela função ancestral, enquanto a cópia (não-RGD) perde seu papel funcional original (Juarez *et al.*, 2008; Bazaaz *et al.*, 2007; McLane *et al.*, 1998).

Originalmente, as desintegrinas foram divididas em três grupos. Esta classificação, porém, não incluía as desintegrinas diméricas (McLane *et al.*, 1998). Atualmente, as desintegrinas de veneno de serpente são classificadas em cinco grupos de acordo com seu tamanho e número de pontes dissulfeto: pequenas, médias, grandes, diméricas e as proteínas tipo desintegrina de metalopeptidases da classe P-III (Calvete *et al.*, 2003).

Desintegrinas pequenas são formadas por 41 a 52 aminoácidos e possuem 4 pontes dissulfeto. Exemplos destas desintegrinas são a echistatina, eristocophina, eristostatina e ocellatusina; uma exceção é a acutina, de *Deinagkistrodon acutus*, que contém apenas sete cisteínas (Smith *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 1993; Calvete *et al.*, 1992). As desintegrinas de tamanho médio possuem cerca de 70 aminoácidos e seis pontes dissulfeto. A maioria das desintegrinas se enquadra neste grupo e seus membros possuem a sequência adesiva RGD. Exemplos de desintegrinas desta classe incluem a trigramina, kistrina, flavoridina, entre outras (Calvete *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 1993; Calvete *et al.*, 1992). As desintegrinas de

tamanho grande possuem cerca de 84 aminoácidos e seis pontes dissulfeto. Exemplos desta classe são bibistatina (Calvete *et al.*, 1994) e a salmosina (Park *et al.*, 1998).

Desintegrinas diméricas fazem parte do mais recente grupo descoberto, ampliando as fronteiras do que se pode chamar de “desintegrinas clássicas”. Este grupo é formado por desintegrinas diméricas, com quatro pontes dissulfeto intracadeia e duas pontes dissulfeto intercadeia. A primeira diferença entre estas e as desintegrinas monoméricas é a presença das pontes dissulfeto intercadeia e a perda do pareamento de uma cisteína em alguma subunidade. Outra característica é a existência de homo e heterodímeros, além de uma variedade de resíduos presentes no motivo adesivo de cada cadeia (McLane *et al.*, 2004; Moreno-Murciano *et al.*, 2003). As desintegrinas homodiméricas possuem arranjos RGD em ambas as cadeias, como a contortostatina (Tripathi *et al.*, 1994). As desintegrinas heterodiméricas exibem uma variedade de arranjos nos sítios ligantes. Um exemplo é a desintegrina EC3, isolada de *Echis carinatus*, que possui o motivo VGD na cadeia A e o tripeptídeo MLD na cadeia B (Coelho *et al.*, 2004).

As proteínas tipo desintegrina de SVMPs de classe P-III possuem aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos e 16 resíduos de cisteína envolvidos na formação de oito pontes dissulfeto (Calvete *et al.*, 2000; McLane *et al.*, 1998). Estas desintegrinas não possuem a sequência RGD em sua estrutura.

As desintegrinas têm sido estudadas como potentes ligantes de receptores plaquetários e de outras células, providenciando não apenas esclarecimento das relações estrutura-função, mas também sendo propostas como exemplo de fármaco natural. Devido a sua alta afinidade e seletividade por integrinas, as desintegrinas podem ser consideradas antagonistas das moléculas de adesão. No entanto, estudos recentes demonstraram que estas proteínas podem

ativar vias de sinalização mediadas por integrinas, indicando que as desintegrinas podem ser consideradas tanto antagonistas como agonistas de funções relacionadas a integrinas, dependendo do tipo celular (Coelho *et al.*, 2004).

Recentemente, diversas desintegrinas têm sido propostas como novas drogas terapêuticas (Selistre-de-Araujo *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005; Braud *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Para caracterizar estas proteínas, é possível purificar a desintegrina a partir do veneno bruto (Oliveira *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2008; Calvete *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2000) ou utilizar técnicas de clonagem para expressar a proteína a partir de células procariontes ou eucariontes (Anangi *et al.*, 2007; Singhamatr e Rojnuckarin, 2007; Zhou *et al.*, 2004b; Paine *et al.*, 1992).

No entanto, a purificação de desintegrinas a partir de veneno bruto é um procedimento caro e demorado, se tornando inviável para a produção em larga escala. A produção recombinante de desintegrinas representa um sistema mais rápido, com melhor rendimento e com qualidade mais constante quando comparada com a obtenção a partir do veneno bruto (Mineia *et al.*, 2005).

Recentemente foi concluído em nosso laboratório um trabalho abrangendo a subclonagem, expressão, purificação e renaturação da desintegrina RGD DisBa-01 (Ramos *et al.*, 2008), uma desintegrina de *Bothrops alternatus* com atividade anti-metastática, anti-angiogênica e anti-trombótica.

#### **1.4.1 DisBa-01**

Uma biblioteca de cDNA em fagos  $\lambda$  foi construída a partir de mRNAs presentes na glândula venenífera de *Bothrops alternatus*. Desta biblioteca foi isolado um clone que codifica uma desintegrina de classe P-II média (78 aminoácidos e 11.637 Da), com motivo de reconhecimento RGD, estrutura terciária mantida por seis pontes dissulfeto e similaridade com outras desintegrinas tanto do gênero *Bothrops* quanto de outros gêneros, como *Agkistrodon*, *Gloydia* e *Trimeresurus*. Esta desintegrina foi obtida de modo heterólogo em corpos de inclusão em *Escherichia coli* e é denominada DisBa-01 (Ramos *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que esta desintegrina se liga às integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , demonstrando potente atividade anti-metastática, anti-angiogênica e anti-trombótica, além de ser um potente inibidor de mecanismos de aderência dependentes de  $\alpha_v\beta_3$  (Kauskot *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2008). Além disso, a DisBa-01 é capaz de inibir eficientemente (na ordem de nanomolar) a agregação plaquetária induzida por ADP, trombina e fibrinogênio e, *in vivo*, prolonga o tempo de oclusão trombótica e de sangramento (Kauskot *et al.*, 2008).

## 1.5 Integrinas

As interações célula-célula e célula-MEC determinam desde a formação de um tecido até eventos como migração, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, polarização e organização do citoesqueleto. A especificidade da adesão celular vem da expressão

combinatória e interações entre receptores de adesão na superfície celular (Hynes *et al.*, 1999).

A matriz extracelular (MEC) preenche a maior parte dos espaços intercelulares e é composta por proteínas insolúveis, carboidratos e fatores de crescimento secretados pelas células. Sua composição varia de acordo com o tecido, com diferentes quantidades e combinações de colágeno, proteoglicanas, elastina, ácido hialurônico e glicoproteínas como fibronectina e laminina (Hynes *et al.*, 1999).

Eventos de adesão celular são mediados por receptores transmembrana, que incluem as integrinas, imunoglobulinas, caderinas e selectinas (figura 3). As integrinas são responsáveis pelo reconhecimento e adesão a proteínas da MEC e a outras células (Saiki, 1997).

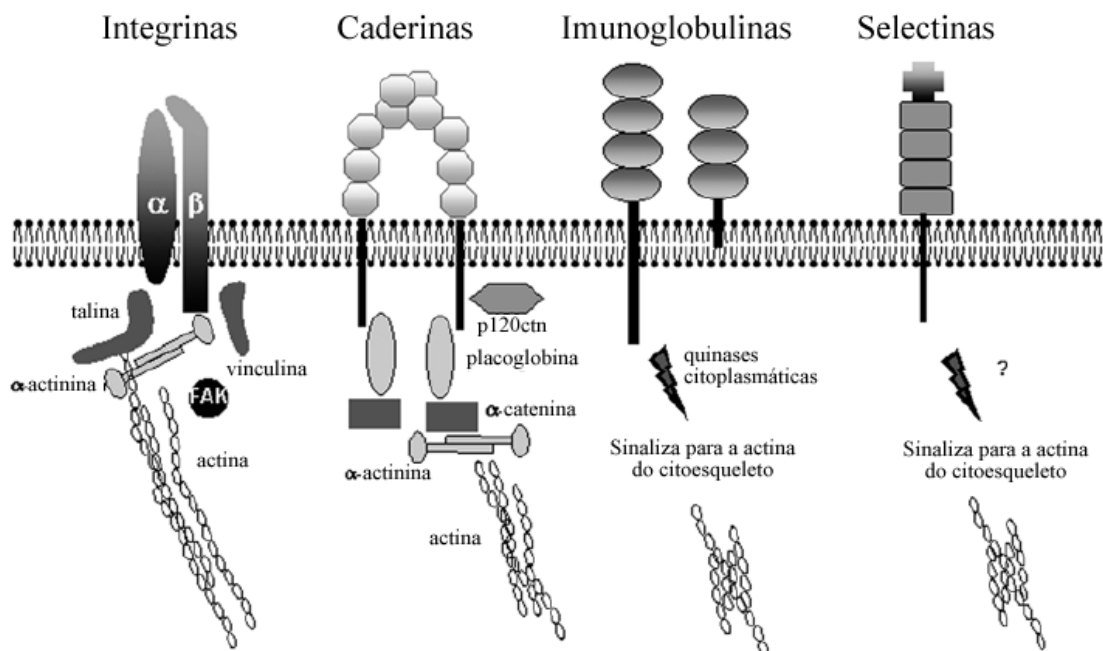


Figura 3: Receptores de adesão celular.

Retirado e adaptado de Hauck (2002).

As imunoglobulinas são proteínas transmembrana responsáveis por mediar adesões célula-célula homofílicas e heterofílicas (Stromblad e Cheresh, 1996). É a segunda maior classe de receptores de adesão, caracterizada pela presença de um grande número de domínios (Hynes *et al.*, 1999).

As caderinas são glicoproteínas transmembrana que atuam na adesão celular, principalmente na adesão célula-célula. N-caderinas humanas estão presentes em baixas concentrações nas células endoteliais (Stromblad e Cheresh, 1996). Elas mediam a adesão hemofílica dependente de cálcio entre células por meio de repetições cadeirinas distantes. Análises estruturais e funcionais sugerem que a unidade funcional é um dímero (Hynes *et al.*, 1999).

As selectinas são outro grupo de glicoproteínas transmembrana de adesão células, que incluem E-selectina, L-selectina e P-selectina. E- e P-selectina são encontradas tanto em forma transmembrana, intermediando interações célula-célula, quanto em forma solúvel (Stromblad e Cheresh, 1996).

A maior família de receptores de adesão são as integrinas. O termo integrina foi proposto por Hynes e colaboradores (1987) para designar receptores que integram o citoesqueleto à MEC. As integrinas são os principais receptores dos metazoários para a adesão celular às proteínas de matriz e, em vertebrados, têm papel importante na ligação célula-célula (Hynes, 2002).

As integrinas são proteínas transmembrana formadas por duas subunidades glicoprotéicas,  $\alpha$  (120 a 180kDa) e  $\beta$  (90 a 110kDa), que se associam por ligações não-covalentes. Dezoito cadeias  $\alpha$  e 8 cadeias  $\beta$  já foram identificadas, formando pelo menos 24 heterodímeros (figura 4). As porções amino-terminais de ambas as cadeias formam uma



“cabeça” globular, enquanto as porções remanescentes formam duas caudas que atravessam a membrana citoplasmática (Silva *et al.*, 2007; Arnaout *et al.*, 2005; Guo e Giancotti, 2004; Hynes, 2002). 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 (Loftus *et al.*, 1994).

A ocorrência de integrinas está restrita ao reino metazoa; elas são encontradas até mesmo nos mais simples organismos deste reino, esponjas e cnidários (Hughes, 2001; Burke, 1999); não há descrição de homólogos em procariotos, plantas ou fungos (Whittaker e Hynes, 2002).

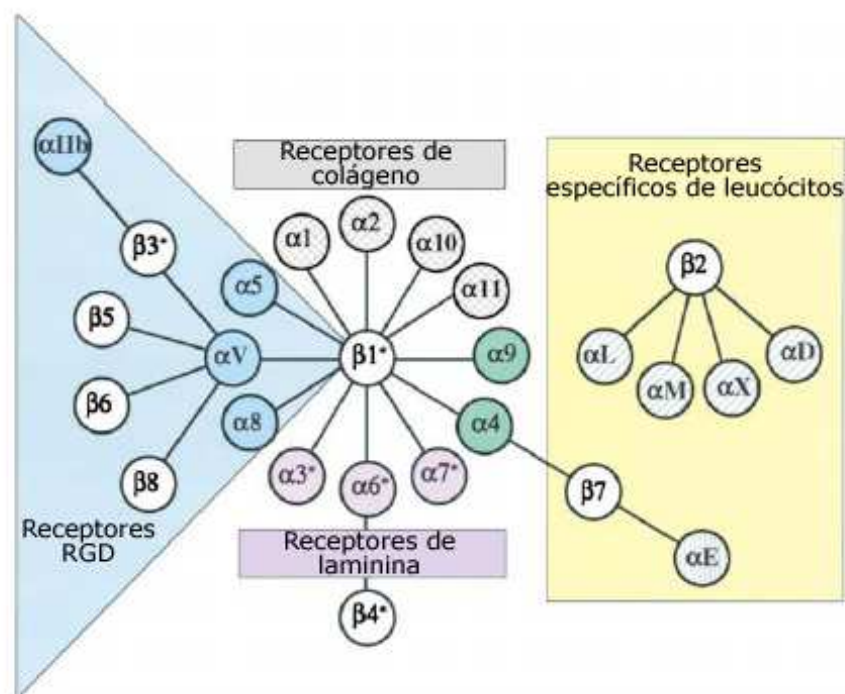


Figura 4: Representação da associação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de integrinas de mamíferos.

Existem 8 tipos de subunidades  $\beta$  que podem se associar a 18 tipos de subunidades  $\alpha$  para formar 24 diferentes heterodímeros. Subunidades  $\alpha$  com listras ou grades cinza são restritas aos cordados, assim como as subunidades

$\alpha_4$  e  $\alpha_9$  (em verde). Subunidades  $\alpha$  em roxo e azul são encontradas em todo o reino metazoa. O asterisco (\*) indica splicing alternativo da porção citoplasmática. Retirado e adaptado de Hynes, 2002.

Combinações de análises genéticas e biológicas têm sido usadas para determinar as funções das integrinas. Na face extracelular, as integrinas interagem com macromoléculas da MEC ou com receptores de superfície de células próximas. Na face citoplasmática, coordenam a organização dos polímeros do citoesqueleto e os complexos de sinalização (Humphries *et al.*, 2006). Todas as integrinas, exceto  $\alpha_6\beta_4$ , se ligam à rede de microfilamentos de actina, a qual as integrinas também regulam e modulam. A subunidade  $\beta_4$  difere de todas as outras: seu domínio citoplasmático é muito maior (cerca de 1000 resíduos de aminoácidos contra aproximadamente 50 das outras subunidades) e se liga aos filamentos intermediários, não à actina (Hynes, 2002).

As sequências de aminoácidos das integrinas sugerem fortemente que ambas as subunidades transpõem a membrana devido a um segmento que cada polipeptídeo tem com características de domínios transmembrana próximo ao C-terminal. A fosforilação do domínio citoplasmático pode regular as funções de ligação destes receptores de adesão (Ruoslahti *et al.*, 1994).

As integrinas se ligam a componentes específicos da matriz, como fibronectina, vitronectina, laminina e colágeno. Muitas dessas associações são específicas para certas combinações de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  e influenciam a sinalização intracelular (Lan *et al.*, 2005; Giancotti, 2000). Entretanto, integrinas distintas podem reconhecer domínios diferentes da mesma molécula, transmitindo sinais que regulam proteases de degradação de matriz (Brooks, 1996).

Diversas integrinas estão envolvidas diretamente no processo de adesão, mobilização e fusão de mioblastos em miotubos (Peault *et al.*, 2007; Shi e Garry, 2006; Lafuste *et al.*, 2005; Velleman e McFarland, 2004). As integrinas  $\alpha_7\beta_1$  (Liu *et al.*, 2008; Burkin *et al.*, 2005),  $\alpha_v\beta_2$  (Tannu *et al.*, 2004) e  $\alpha_9\beta_1$  (Lafuste *et al.*, 2005), entre outras, estão diretamente relacionadas a proliferação e adesão celular, miogênese e diferenciação, respectivamente.

A sinalização oriunda da ligação entre integrinas e os componentes da MEC é enviada para dentro da célula por meio de diferentes cascatas de sinalização em um processo denominado “de fora para dentro” (“outside-in”). Além disso, há a regulação intracelular que modifica as propriedades de ligação externa das integrinas, chamado “de dentro para fora” (“inside-out”) (Yamada, 1997). Sinais induzidos por integrinas incluem troca de  $H^+$ , influxo de  $Ca^{2+}$ , fosforilação de tirosina, serina e treonina, entre outros. Muitas vezes, estes sinais são relacionados à regulação da expressão gênica, contribuindo para mecanismos como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Stromblad e Cheresch, 1996).

Foi demonstrado que a cauda citoplasmática das integrinas pode interagir com componentes específicos do citoesqueleto, como actina- $\alpha$ , talina e vinculina; estas interações são capazes de potencializar inúmeros eventos de sinalização transmembrana, incluindo ativação de Rho GTPase, permitindo mudanças na organização do citoesqueleto, ativação de vias de proteínas-quinase ativadora de mitose (MAPK), diversas proteínas quinases e quinases de lipídios. Assim, as integrinas são capazes de influenciar a progressão do ciclo celular, sobrevivência celular e expressão gênica, além de seus efeitos na adesão e morfologia celular (Ruegg e Mariotti, 2003; Hynes *et al.*, 1999).

Muitas integrinas não são constitutivamente ativas; elas podem ser expressas na superfície celular em um estado inativo, no qual elas não se ligam aos ligantes nem enviam

sinais para o interior celular. Este mecanismo é muito importante para suas funções biológicas. Um exemplo é a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ; presente em grande quantidade na superfície plaquetária, se não estivessem inativas elas se ligariam ao seu principal ligante presente no plasma, o fibrinogênio, e agregariam, levando a trombose. Quando as plaquetas são ativadas, a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  passa a se ligar a fibrinogênio, fator Von Willebrand e fibronectina (Hynes, 2002).

Antagonistas de integrinas têm sido estudados em uma tentativa de desenvolver novas ferramentas para o tratamento de diversos tipos de patologias, incluindo cânceres. Estudos demonstram que peptídeos sintéticos contendo o motivo Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RGD) são capazes de bloquear competitivamente a ligação de várias integrinas aos seus ligantes, reduzindo a quantidade de metástases experimentais (Saiki, 1997); outros motivos também são capazes de bloquear interações integrina-ligante específicas (figura 5) (Juarez *et al.*, 2008).

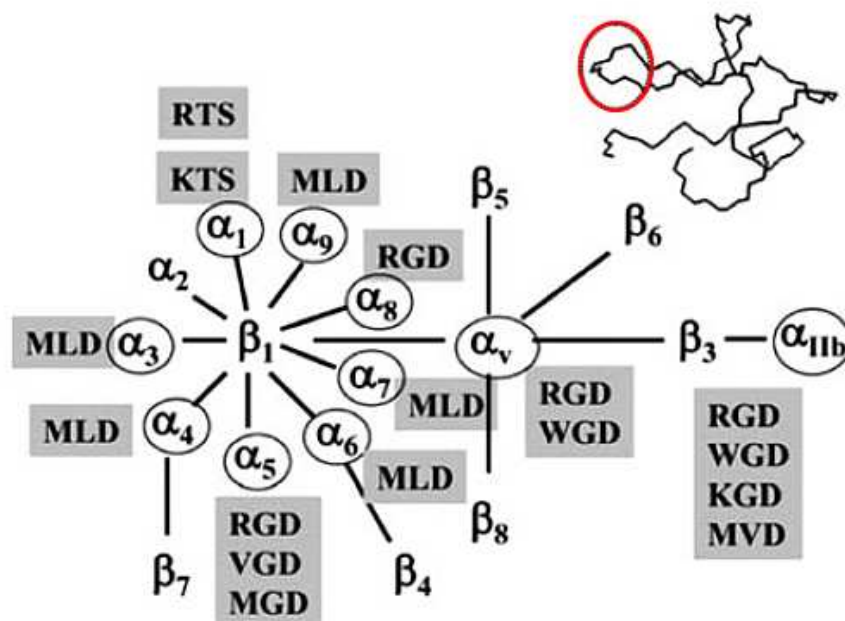


Figura 5: Diagrama da família de integrinas.

Na imagem também estão representados os diferentes motivos de domínios desintegrinas que bloqueiam interações integrina-ligante específicas, e um modelo 3D de uma desintegrina pequena com ênfase na localização do motivo inibitório (círculo vermelho). Extraído e adaptado de Juárez *et al* 2008.

Além disso, existem estudos que indicam que desintegrinas e proteínas tipo desintegrina podem regular positiva ou negativamente a expressão de determinados genes por meio da ligação com integrinas. Gallagher *et al.* (2005) propuseram que a jararagina, uma proteína tipo desintegrina, é capaz de regular positivamente a via MAPK p38 a partir da regulação positiva de IL-1 em células endoteliais. A ALT-C, outra proteína tipo desintegrina, induz a um aumento de expressão de VEGF em fibroblastos e células HUVEC (Ramos *et al.*, 2007; Cominetti *et al.*, 2004) e, *in vivo*, é capaz de modular a expressão de VEGF, FGF-1, PDGF, TGF $\beta$ 1 e IGF-1 em ratos (Sant'Ana *et al.*, 2008). A jarastatina, uma proteína RGD monomérica, induz o aumento da transcrição de IL-8 em neutrófilos (Coelho *et al.*, 1999). Já a saxatilina inibe a expressão de VEGF em células de câncer de pulmão (Jang *et al.*, 2007).

As modificações bioquímicas mediadas por integrinas interferem em processos biológicos, por meio da sinalização “de dentro para fora” e “de fora para dentro” e pela modulação da expressão de certos genes, levando a respostas celulares de ativação, migração, diferenciação ou apoptose (Chen e Lo, 2003; Coelho *et al.*, 2001).

## 1.6 Células tronco

Células tronco têm a habilidade única de se diferenciar em todos os tipos celulares, podendo substituir célula mortas ou danificadas (Cowan *et al.*, 2004) e são recrutadas de

nichos específicos para atuar em diferentes locais, que podem ser distantes do local de recrutamento (Katayama *et al.*, 2006). Estas células podem ser obtidas tanto de embriões, derivadas do blastocisto (Dejosez *et al.*, 2008; Thomson *et al.*, 1998; Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981), quanto de indivíduos adultos, sendo encontradas principalmente na medula óssea, periósteo, membrana sinovial, músculo esquelético, tecido adiposo, sangue periférico, cordão umbilical e músculo cardíaco (Roccio *et al.*, 2008; Boelens *et al.*, 2007; Sakaguchi *et al.*, 2005), além de serem encontradas também no fígado, cérebro e pâncreas, entre outros (Porada *et al.*, 2006). Entretanto, somente células tronco de embriões podem se diferenciar em qualquer tipo celular; células-tronco de indivíduos adultos podem se diferenciar somente em tipos celulares específicos (Pan e Thomson, 2007; Pan *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2005).

As células tronco mesenquimais (MSC) são células tronco de indivíduos adultos encontradas em uma variedade de tecidos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, tecido muscular, placenta e cordão umbilical (Sarugaser *et al.*, 2009). Apesar de não se diferenciarem em todos os tipos celulares, as MSC são células multipotentes capazes de se diferenciar *in vitro* e *in vivo* em tecidos de origem mesenquimal (Wang e Zhao, 2009), originando osteoblastos, mioblastos, condroblastos, adipócitos e células estromais (Larghero *et al.*, 2009), além de hepatócitos, miócitos cardíacos, miofibroblastos, fibroblastos, células endoteliais, inclusive no processo de formação de novos vasos sanguíneos, e células satélite de músculo esquelético (Nicholas e William, 2008).

As células satélite participam do processo de regeneração muscular, diferenciando-se em células precursoras miogênicas e, subsequentemente, em miofibras (Zammit *et al.*, 2006), além de serem capazes, *in vitro*, de se diferenciar em osteócitos e adipócitos (Susperregui *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2007; Asakura *et al.*, 2001; Teboul *et al.*, 1995; Katagiri *et al.*, 1994). Estas células são fundamentais para o processo de regeneração muscular e há evidências de

que participam de processos patogênicos envolvendo formação de tecido adiposo ou ósseo ectópicos no tecido muscular (Charge e Rudnicki, 2004).

### **1.6.1 Células precursoras miogênicas**

Desde que foi reportada a capacidade que tecidos musculares têm de regenerar musculatura distrófica em camundongos, um esforço substancial tem sido feito para isolar as melhores células-tronco musculares, capazes de restaurar ou substituir fibras esqueléticas distróficas e de criar um reservatório de células-tronco que perdurem por toda a vida (Boldrin e Morgan, 2007).

O músculo esquelético, em todos os organismos, é composto por células musculares maduras conhecidas como miotubos. São células multinucleadas que surgem da fusão de células precursoras multinucleadas, os mioblastos, durante o desenvolvimento embrionário. Entretanto, nem todos os mioblastos se fundem em miotubos; alguns permanecem como células satélite no músculo adulto (Blanco-Bose *et al.*, 2001). Em camundongos recém-nascidos, células satélite representam cerca de 30% dos núcleos no músculo sublaminaar; este número cai para menos de 5% em camundongos com dois meses de vida. Este declínio reflete a fusão das células satélite durante o crescimento do músculo esquelético (Seale *et al.*, 2000; Bischoff e Heintz, 1994). Lees *et al.* (2006) reportaram que a massa muscular relativa de ratos idosos (32 meses de idade) é consideravelmente menor que a de ratos jovens (3 meses de idade), variando de 51% a 62% de diferença; as células precursoras miogênicas (CPMs) extraídas dos ratos jovens e idosos também apresentaram diferenças na capacidade de diferenciação e na expressão de proteínas relacionadas ao processo, indicando que há

diferenças celulares e moleculares entre CPMs isoladas do músculo esquelético de jovens e adultos, contribuindo para a redução de massa muscular e falhas no reparo e reconstrução de músculos danificados em idosos.

As células satélite foram primeiramente descritas em músculo de sapos por Mauro (1961), com base na morfologia e posição relativa aos miotubos maduros; posteriormente foram identificadas também em músculos adultos de aves e mamíferos (Seale e Rudnicki, 2000). As células satélite ficam em posição adjacente às fibras do músculo esquelético, entre a membrana basal e o sarcolema, de forma que a membrana basal é contínua ao longo de toda a fibra muscular. Com uma baixa quantidade de citoplasma em relação ao núcleo, as células satélite possuem poucas organelas citoplasmáticas e grande quantidade de heterocromatina em relação à eucromatina, indicadores do estado inativo da célula (figura 6) (Shi e Garry, 2006; Holterman e Rudnicki, 2005; Schultz, 1976).

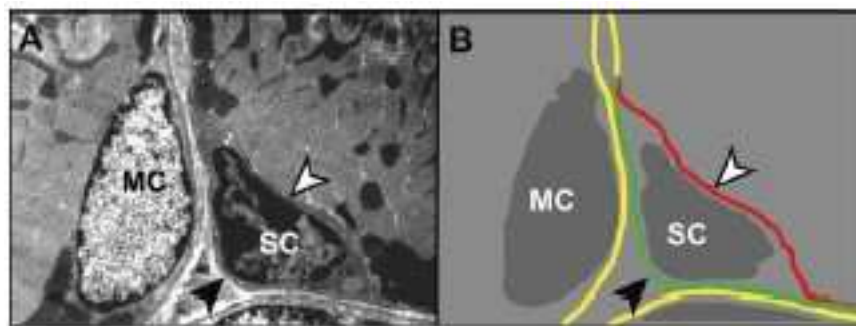


Figura 6: Localização das células satélite.

A: eletromicrografia de músculo esquelético adulto demonstrando o núcleo de um miócito (MC) e de uma célula satélite (SC). A célula precursora é caracterizada pelo menor tamanho, alta proporção núcleo/citoplasma, baixa quantidade de organelas citoplasmáticas e heterocromatina nuclear aumentada, indicando o estado de quiescência da célula. B: esquema da imagem A, enfatizando o posicionamento da célula satélite entre a lâmina basal (seta escura na linha verde) e o sarcolema (seta clara na linha vermelha). Retirado de Shi e Garry, 2006.



Em músculos esqueléticos adultos, as células satélite geralmente ficam num estado quiescente, mas, em resposta ao estresse gerado por exercícios ou traumas, podem ser ativadas, expressando diversos fatores de transcrição miogênicos incluindo MyoD e Myf5, e iniciando múltiplas rodadas de multiplicação e posterior diferenciação em miotubos (Bischoff e Heintz, 1994; Rosenblatt *et al.*, 1994; Appell *et al.*, 1988). Após a ativação, a morfologia das células satélite muda drasticamente; extensões citoplasmáticas ficam aparentes, acompanhadas por um aumento no volume de citoplasma. A quantidade de heterocromatina diminui e organelas citoplasmáticas, como Golgi, retículo endoplasmático, ribossomos e mitocôndrias, aumentam em quantidade (Holterman e Rudnicki, 2005; Hawke e Garry, 2001; Schultz, 1976). Estas células geradas por células satélite ativadas, chamadas de células precursoras miogênicas (CPMs), se dividem várias vezes antes de se fundirem a miofibras existentes ou recém-formadas (figura 7) (Morgan e Partridge, 2003; Bischoff e Heintz, 1994; Grounds e Yablonka-Reuveni, 1993; Appell *et al.*, 1988).

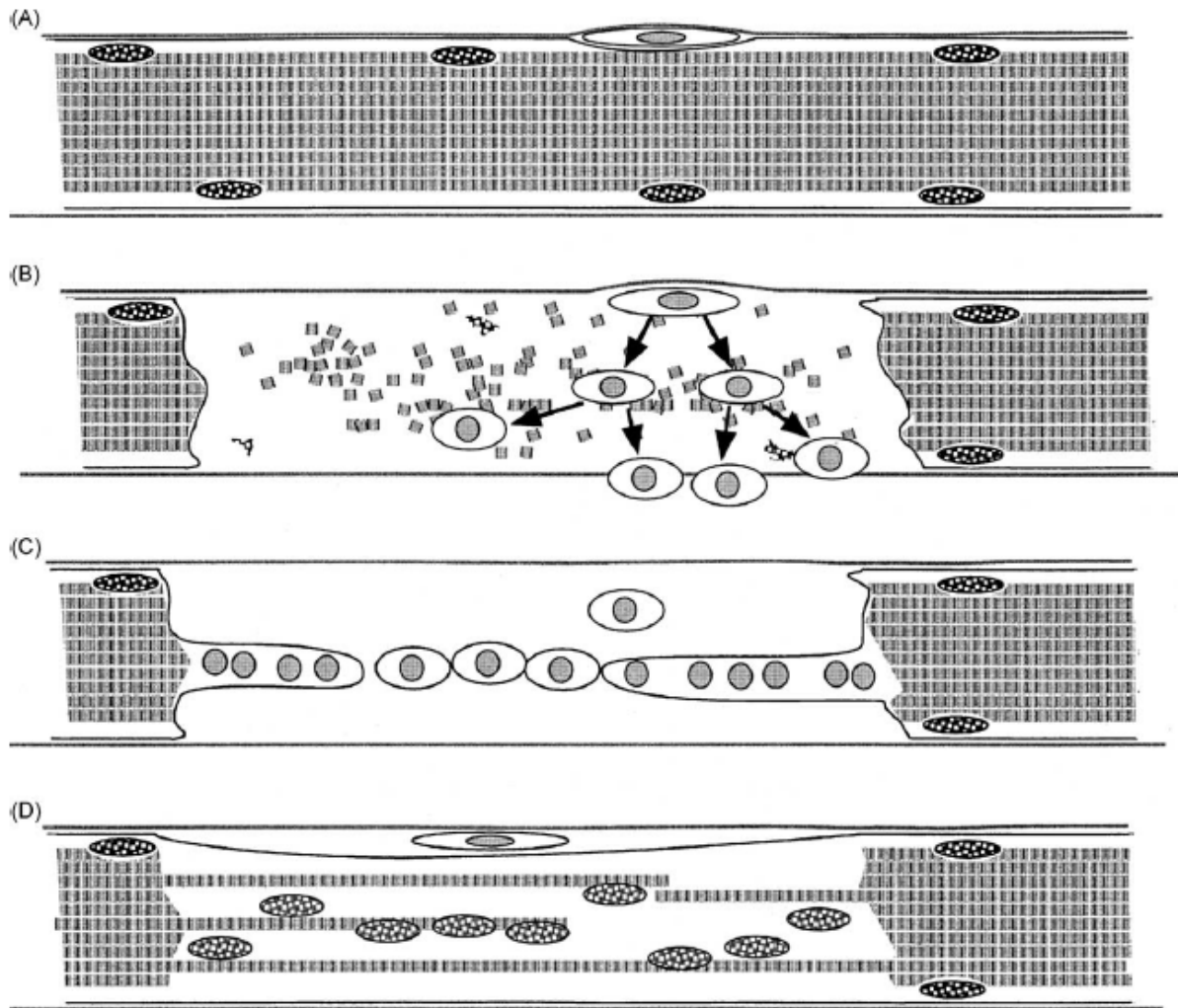


Figura 7: Fibra muscular em processo de regeneração.

A: fibra muscular normal com mionúcleos e uma célula satélite quiescente. B: fibra muscular danificada. A célula satélite se tornou ativada, originando CPMs. C: CPMs se fundem para reparar a fibra muscular danificada. D: fibra muscular regenerada, com uma nova célula satélite e mionúcleos no centro da fibra. Retirado de Morgan e Partridge 2003.

CPMs têm boa sobrevivência ao longo do tempo, capacidade de formar novos miotubos e unidades motoras e ótimo potencial de crescimento, sendo facilmente multiplicadas quando em estado indiferenciado. Entretanto, após a formação de miotubos estas células se diferenciam em fibras maduras e perdem a capacidade mitótica, tornando improvável o crescimento desordenado de tecido muscular *in vivo* (Eberli *et al.*, 2009; Yiou *et*

*al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2001; Partridge *et al.*, 1989). Estudos demonstram que as CPMs são capazes de se diferenciar não somente em miotubos, mas também em osteócitos e adipócitos, *in vitro*, se forem tratadas com proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) ou indutores adipogênicos, assim como as células satélite (Susperregui *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2007; Asakura *et al.*, 2001; Teboul *et al.*, 1995; Katagiri *et al.*, 1994). A pluripotência destas células ainda não foi demonstrada *in vivo*, mas o acúmulo de tecido adiposo e a formação de tecido ósseo ectópico no tecido muscular em algumas doenças humanas sugerem que estas células sejam capazes de desenvolvimento não-miogênico *in vivo* (Charge e Rudnicki, 2004).

A fusão de CPMs em miotubos é o resultado de uma sequência ordenada de eventos, incluindo agrupamento e alinhamento de células, estabelecimento de contatos célula-célula e fusão das membranas citoplasmáticas (Taylor, 2003; Doberstein *et al.*, 1997). Em mamíferos, a fusão ocorre em duas fases: inicialmente mioblastos se fundem a outros para formar pequenos miotubos; adicionalmente, outras CPMs se fundem aos miotubos recém-formados para gerar miotubos maiores e maduros (Jansen e Pavlath, 2006; Chen *et al.*, 2005). Diversas proteínas de membrana estão envolvidas nestes processos, incluindo N- e M-caderinas, moléculas neurais de adesão celular (NCAM), moléculas vasculares de adesão celular (VCAM),  $\alpha_4\beta_1$  e outras integrinas, entre diversas moléculas (Abmayr *et al.*, 2003).

Yao *et al* (1996) demonstraram que a integrina  $\alpha_7\beta_1$ , o principal receptor de laminina em mioblastos, media a adesão e migração celular em substratos contendo laminina 1 e sugerem que o receptor  $\alpha_7$  esteja envolvido não só na interação com isoformas específicas de laminina em fibras musculares maduras mas também durante o recrutamento e expansão das CPMs durante a regeneração muscular. Sinanan *et al* (2008) demonstraram que as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  (receptores de fibronectina e vitronectina, entre outros componentes da MEC) são marcadores moleculares para CPMs *in vitro*, independente da idade do doador, derivação

anatômica ou espécie, e também atuam como moduladores da migração de CPMs. As integrinas  $\alpha_9\beta_1$  (Lafuste *et al.*, 2005) e  $\alpha_3$  (Brzoska *et al.*, 2006) estão diretamente relacionadas com a adesão e fusão de CPMs em miotubos.

Estudos sobre a regeneração muscular têm despertado interesse nas áreas médica e esportiva, para diminuir o tempo necessário para a recuperação de atletas após danos musculares, diminuir os sintomas de distrofia muscular e acelerar a recuperação de força causada por atrofias (Grounds *et al.*, 2002). Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito de desintegrinas em mioblastos.

Em nosso laboratório foi demonstrado que o efeito da ALT-C, uma proteína tipo desintegrina rica em cisteína de *Bothrops alternatus*, foi capaz de induzir um aumento na proliferação de mioblastos primários de ratos *in vitro* (Mesquita-Ferrari *et al.*, 2009); *in vivo*, a ALT-C promoveu angiogênese em camundongos atímicos (Ramos *et al.*, 2007) mas não foi capaz de estimular a regeneração muscular em ratos (Durigan *et al.*, 2008). Estudos em nosso laboratório também mostraram que, *in vitro*, a ALT-C induz a expressão de VEGF em fibroblastos (Cominetti *et al.*, 2004).

Os resultados destes trabalhos nos incentivaram a estudar os efeitos de outras desintegrinas na regeneração muscular. Em um trabalho com DisBa-01 em ratos, esta desintegrina estimulou a formação de uma membrana rica em colágeno que cobriu o anel herniário e impediu o extravasamento do conteúdo abdominal, estimulou a angiogênese e aumentou o número de células mononucleadas e de fibroblastos. Além disso, a ativação de MMP-2 nos ratos tratados foi aumentada, sugerindo um maior remodelamento da MEC (Oliveira *et al.*, dados não publicados, 2009).

Neste contexto, a DisBa-01 foi utilizada para este trabalho, para a avaliação de seus efeitos sobre uma linhagem de células precursoras miogênicas, a C2C12. Escolhemos analisar o material secretado pelas células C2C12 para tentar identificar algum possível mediador da ação da DisBa-01.

### 1.6.2 C2C12

Culturas primárias e linhagens celulares musculares estabelecidas têm sido usadas para estudos *in vitro*. Uma linhagem frequentemente usada é a de mioblastos de camundongos C2C12, um subclone da linhagem C2 derivada de células satélite de ratos adultos (Blau *et al.*, 1985; Yaffe e Saxel, 1977). Mioblastos C2 e C2C12 provenientes de camundongos são as linhagens miogênicas mais caracterizadas e empregadas atualmente, pois proliferam rapidamente sob condições normais de cultura e respondem bem à manipulação, com resultados reproduzíveis, de uma maneira melhor que culturas de mioblastos primários (Gawlitta *et al.*, 2008; Burattini *et al.*, 2004; Tannu *et al.*, 2004; Lawson e Purslow, 2000; Shimokawa *et al.*, 1998; Kubo, 1991; Yaffe e Saxel, 1977).

As células C2C12 são muito utilizadas em modelos de diferenciação em músculo esquelético. A diferenciação em miofibras é terminal e, geralmente, induzida pela substituição do soro fetal bovino utilizado no meio de crescimento por soro de cavalo, no chamado meio de diferenciação (Ji *et al.*, 2009; Anastasia *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2003; Hitomi *et al.*, 2000; Koh *et al.*, 1993). Entretanto, alguns mioblastos não se diferenciam e, quando as condições normais de crescimento são retomadas, estas células voltam a proliferar (Yoshida *et al.*, 1998). Além disso, também são utilizadas em modelos de diferenciação não-miogênica, em

osteoblastos e adipócitos, por meio de adição de BMPs ou indutores adipogênicos (Susperregui *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2007; Teboul *et al.*, 1995; Katagiri *et al.*, 1994).

No entanto, são poucos os estudos sobre os efeitos de desintegrinas nas células C2C12 não diferenciadas. Já foi demonstrado que a proteína tipo desintegrina ALT-C não foi capaz de induzir a expressão de VEGF em cultura primária de células precursoras miogênicas (Mesquita-Ferrari *et al.*, 2009). Estes resultados despertaram o interesse sobre o efeito de outras desintegrinas em CPMs. Assim, esta linhagem foi escolhida para a avaliação dos efeitos da desintegrina RGD DisBa-01 sobre os mioblastos indiferenciados.

## 1.7 Proteoma

O termo proteoma foi utilizado pela primeira vez por Wilkins (1996) para referir-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo ou, no caso de seres multicelulares, ao complemento protéico expresso por um tecido ou tipo celular específico. Ao contrário do genoma, o proteoma de um indivíduo é extremamente dinâmico e variável e não se mantém estável durante a vida do organismo. Entretanto, apesar das proteínas serem uma fonte muito rica de informações, elas também são difíceis de serem analisadas devido ao seu dinamismo, pois sua expressão se altera conforme o estímulo recebido (Wilkins *et al.*, 1996). As proteínas estão envolvidas em todos os processos biológicos e podem ser consideradas as moléculas mais importantes para a manutenção da homeostase e para o desenvolvimento dos organismos (Aebersold e Mann, 2003).

A análise proteômica permite saber se e quando uma proteína está sendo expressa, qual a concentração relativa dessa proteína e as modificações que podem ocorrer após sua

tradução, além de indicar como processos metabólicos, regulatórios e de sinalização podem ser modificados por estados patológicos ou por interação com medicamentos e outras substâncias administradas (Anderson *et al.*, 2000).

Por meio da eletroforese bidimensional (2DE), que separa proteínas em géis de poliacrilamida desnaturantes, é possível separar simultaneamente centenas ou milhares de proteínas em um único gel. Além disso, esse método permite a detecção de modificações pós-traducionais, que não poderiam ser previstas com a sequência genômica (Lopez, 2007; Pandey e Mann, 2000; O'Farrell, 1975).

O estudo de proteínas por meio da 2DE foi restrito, durante certo período, pelas dificuldades com a análise, incluindo a baixa resolução e reprodutibilidade. Com o desenvolvimento de novas técnicas e matrizes, a análise proteômica por 2DE têm sido sensivelmente aprimorada (Pandey e Mann, 2000).

Atualmente, as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico por meio de focalização isoelétrica, na primeira dimensão. Em seguida, as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares, na segunda dimensão. A 2DE tem sido utilizada para o estabelecimento de mapas-padrão de células, tecidos e modelos de desenvolvimento, além de permitir a comparação dos produtos protéicos após exposição de grupos celulares a diferentes condições biológicas. A análise comparativa dos mapas gerados permite a identificação de proteínas com acúmulo diferencial, induzidas ou suprimidas sob diferentes condições (Guerreiro *et al.*, 1997). Em comparação com a eletroforese de uma dimensão em géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), a 2DE apresenta maior capacidade para separar misturas complexas. Como as bandas de proteínas de mesma massa molecular tendem a se sobrepor quando utilizados métodos de eletroforese unidimensional, um número

relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50) pode ser separado por esses métodos. A eletroforese bidimensional, ao combinar dois métodos distintos de separação, pode ser utilizada para separar mais de 1000 proteínas em cada gel (McArdle *et al.*, 2003).

Este método é muito utilizado para a resolução de amostras com um grande número de proteínas distintas e suas isoformas, como o veneno de serpentes (Fox e Serrano, 2008a; Serrano *et al.*, 2005), a expressão protéica de um determinado tecido em diferentes idades (Fiorani Celedon *et al.*, 2007), identificar proteínas virais em células hospedeiras (Zhang *et al.*, 2004) e as diferenças de expressão protéica entre células não infectadas e infectadas (Kuramitsu e Nakamura, 2005), entre outros usos.

Nesse contexto, a utilização da eletroforese bidimensional será útil para analisar a expressão protéica das células C2C12 após tratamento com a desintegrina DisBa-01, em comparação com células não tratadas. Esta técnica, associada à espectrometria de massas, permitirá a identificação dos produtos de secreção dos mioblastos.



## **2. OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivos:

Estudar os efeitos da DisBa-01 em células precursoras miogênicas (C2C12) em cultura.

Padronização da metodologia de eletroforese bidimensional para o meio condicionado das células C2C12, para contribuir na identificação dos mediadores do efeito da DisBa-01 neste tipo celular.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Expressão da DisBa-01

A DisBa-01 foi expressa de acordo com o método descrito por Ramos (2008).

A cultura de células BL21 (DE3) foi induzida por adição de 0,5nM de IPTG. Após 3 horas de indução, as células foram centrifugadas (4.200 x g por 15min), ressuspensas em tampão A (Tris-HCl 40nM pH 7.9, NaCl 500mM e imidazol 5mM) e lisadas por sonicação (6 vezes a 4°C; intervalo de 10s). A fração celular solúvel foi obtida após centrifugação (27.500 x g por 15min) e o sedimento foi ressuspenso no tampão B (Tampão A contendo 6M de uréia). As células foram lisadas novamente por sonicação (6 vezes a 4°C; intervalo de 10s). O lisado foi incubado em banho de gelo por 1 hora. A fração solúvel obtida em condições desnaturantes foi separada por centrifugação (27.500 x g; 15min) e as amostras foram analisadas por SDS-PAGE.

A purificação da DisBa-01 ocorreu em dois passos. Inicialmente, cromatografia de afinidade (Ni-NTA Sepharose, Qiagen), realizada sob condições desnaturantes à temperatura ambiente. A coluna foi equilibrada com tampão B e a amostra foi aplicada. Após lavar as proteínas que não se ligaram à coluna, a proteína alvo foi eluída em um gradiente isocrático com 4 volumes de coluna do tampão C (Tris-HCl 40mM; pH 7.9; NaCl 500mM; imidazol 20 mM; uréia 6M) e 4 volumes de coluna de tampão D (Tris-HCl 40mM; pH 7.9; NaCl 500m M; imidazol 1M; uréia 6M). As frações foram analisadas por SDS-PAGE e as frações contendo a proteína de interesse foram dialisadas 1 vez contra 25 volumes de uréia 3M em água e 3 vezes

contra 50 volumes de água a 4°C, para remover completamente o agente desnaturante. A amostra foi levada a uma coluna Mono Q 5/50 (GE Healthcare) e separada em fluxo constante (1ml/min) com gradiente linear de NaCl (0-1M) com tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,6. As frações foram analisadas em SDS-PAGE 15%. As frações que possuíam somente bandas com o tamanho esperado foram coletadas, dialisadas 3 vezes contra 50 volumes de água a 4°C e mantidas a -20°C até o uso.

A atividade da proteína foi confirmada por meio de ensaio de agregação plaquetária (dados não mostrados) e a concentração de proteína foi estimada pelo método BCA (cristal bicinrônico).

### **3.2 Dosagem de proteínas**

A concentração de proteínas das amostras foi determinada por meio do kit *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* (Pierce), cuja formulação é baseada no método de ácido bicinrônico (BCA) para detecção colorimétrica e quantificação de proteína total. Uma série de diluições de soroalbumina bovina (BSA), de concentração conhecida (25µg/mL a 2000µg/mL), foi preparada e testada juntamente com amostras de concentração desconhecida de acordo com as instruções do fabricante.

A reação produzida por este método apresenta absorvância a 562nm, aproximadamente linear com as concentrações protéicas crescentes no intervalo preparado. Assim, após a leitura da absorvância das reações, a concentração protéica das amostras foi determinada a partir da curva padrão construída através das amostras de BSA.

### **3.3 Células precursoras miogênicas (CPM)**

Células precursoras miogênicas, da linhagem C2C12, foram gentilmente cedidas pela Profª Drª Raquel Agnelli Mesquita Ferrari (UNINOVE) e cultivadas em garrafas plásticas, em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina, 10 mL de solução de penicilina-estreptomicina e 2,5µg/L de anfotericina-B (Fungison – Squibb) a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> (5%).

### **3.4 Ensaios celulares**

A quantidade de células resultantes após incubação com DisBa-01 foi estimada por método colorimétrico (cristal violeta). Imagens das células foram capturadas durante os experimentos para verificar a ocorrência de alterações em sua morfologia.

#### **3.4.1 Ensaio de promoção de adesão**

Para o ensaio de promoção de adesão, foram utilizadas placas de 96 poços, cobertos previamente com 1µg de fibronectina, colágeno tipo I, colágeno tipo III ou colágeno tipo IV, ou com 0,1mg/mL, 1mg/mL e 5mg/mL de DisBa-01, além de poços cobertos com BSA, como

controle negativo (0,02mg/mL). As placas foram incubadas por 14 a 16 horas a 4°C e, em seguida, incubadas a 37°C por 30 minutos antes de serem utilizadas.

Após a incubação as proteínas foram aspiradas dos poços e 100µL de BSA 0,5% foram adicionados a cada poço, para evitar que as células entrassem em contato direto com o plástico por meio de falhas na cobertura protéica. Após incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, a BSA foi aspirado e os poços foram lavados com DMEM sem soro por duas vezes.

As células foram removidas das garrafas de cultura com tripsina, ressuspensas em DMEM sem soro, contadas em câmara de Neubauer e  $5 \times 10^4$  células foram adicionadas em cada poço. A placa foi incubada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 45 minutos.

Após o período de incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado e a capacidade de promoção de adesão da proteína foi avaliada pelo método colorimétrico com cristal violeta.

### **3.4.2 Ensaio de desadesão ou descolamento**

Para este ensaio, foram utilizadas placas de 96 poços cobertos com colágeno tipo I ou fibronectina (0,02mg/mL), além de poços cobertos com BSA (0,02mg/mL), como controle negativo. As placas foram preparadas como descrito no item 3.4.1

As células foram removidas das garrafas de cultura com tripsina, ressuspensas em DMEM sem soro, contadas em câmara de Neubauer e  $5 \times 10^4$  células foram adicionadas em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas.

Terminada a incubação, os mioblastos foram lavados com PBS para a remoção de células não aderidas. Em seguida, a DisBa-01 foi adicionada em diferentes concentrações (10nM a 1000nM) e as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 1h. Após esse período sobrenadante foi removido e as células foram lavadas novamente.

A avaliação da capacidade da proteína de promover o descolamento das células foi realizada pelo método colorimétrico com cristal violeta.

### **3.4.3 Ensaio de inibição de adesão**

Para o ensaio de inibição de adesão, foram utilizadas placas de 96 poços, cobertos previamente com 1µg de fibronectina, colágeno tipo I ou BSA. As placas foram preparadas conforme descrito no item 3.4.1.

As células foram removidas das garrafas de cultura com tripsina, ressuspendidas em DMEM sem soro, contadas em câmara de Neubauer e 15x10<sup>4</sup> células/tratamento foram incubadas com PBS (para o controle positivo) ou DisBa-01 em diferentes concentrações (1nM, 10nM, 100nM e 1000nM) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Em seguida, 100µL de cada solução de células e PBS ou DisBa-01 foram aplicados nos poços, totalizando 5x10<sup>4</sup> células/poço. A placa foi incubada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 45 minutos.

Após o período de incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado e a capacidade de inibição de adesão da proteína foi avaliada pelo método colorimétrico com cristal violeta.

#### **3.4.4 Ensaio de proliferação celular**

As células foram removidas das garrafas de cultura com auxílio de tripsina e ressuspensas em DMEM suplementado com 0,5% de FBS. Após contagem em câmara de Neubauer,  $1 \times 10^3$  células/poço foram incubadas em uma placa de 96 poços estéril por duas horas a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, para que aderissem aos poços. Diferentes concentrações de DisBa-01, variando de 10nM a 1000nM, foram adicionadas às células e as placas foram incubadas por diferentes tempos (24h, 48h ou 72h) nas mesmas condições da adesão.

Após a incubação, o meio de cultura foi removido e congelado a -20°C para análises posteriores e a capacidade de promoção de proliferação celular da DisBa-01 foi avaliada pelo método colorimétrico com cristal violeta.

#### **3.4.5 Método colorimétrico (cristal violeta)**

Após os ensaios de desadesão, promoção e inibição de adesão e proliferação celular, os poços foram lavados com DMEM sem soro por duas vezes, para a remoção das células não aderidas. Em seguida as células foram incubadas por 10 minutos em etanol 70%, para fixação dos mioblastos, em temperatura ambiente. O etanol foi removido, os poços foram lavados com PBS e 60µL de cristal violeta 0,5% (em etanol 20%) foram adicionados em cada poço. Após incubação por 20 minutos em temperatura ambiente, as células foram lavadas por pelo

menos 5x com PBS, para a remoção do excesso de corante. Em seguida, foram adicionados 100 $\mu$ L de SDS 1% para dissolver o precipitado e a placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de placas MRX Dynex (comprimento de onda de 540nm).

### **3.5 Determinação dos receptores de adesão por citometria de fluxo**

As células foram removidas das garrafas de cultura com auxílio de solução de tripsina (tripsina 0,25% e EDTA 0,02%) ou EDTA 0,2% e, após contagem em câmara de Neubauer, 1x10<sup>6</sup> células ressuspensas em 100 $\mu$ L de PBS foram incubadas em gelo com os anticorpos primários contra as integrinas  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\alpha_v \beta_3$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_4$  (Santa Cruz Biotechnology) por 30 minutos, na concentração de 1 $\mu$ g/100 $\mu$ L. Após a incubação, foi adicionado 1mL de PBS para lavagem do excesso de anticorpo e as células foram centrifugadas por 5 minutos a 2.000 RPM. O sobrenadante foi aspirado e as células foram ressuspensas em 100 $\mu$ L de PBS, ao qual foi adicionado 0,5 $\mu$ g de anticorpo secundário (goat anti-mouse IgG, BD Biosciences) conjugado com FITC (Fluoresceína Isotiocianato). Após incubação por 30 minutos no gelo, adicionado 1mL de PBS para lavagem do excesso de anticorpo e as células foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 2.000 RPM. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 500 $\mu$ L de tampão FACS (BD Biosciences) com formaldeído 1% e imediatamente analisadas no citômetro FACSCanto (BD Biosciences).



### 3.6 Eletroforese bidimensional

Os meios condicionados coletados foram centrifugados, para a retirada de restos celulares, e submetidos à quantificação de proteínas totais. Em seguida um volume contendo 430µg de proteínas de cada amostra foi purificado por meio do kit *2-D Clean-Up Kit* (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante, para a remoção do meio de cultura, sais e possíveis resíduos de DNA e RNA. As proteínas foram ressuspensas em tampão de reidratação – TR (Uréia 8M, CHAPS 3%, IPG Buffer pH 3-10 1%, Azul de Bromofenol 0,002%).

Após a purificação as amostras foram resolvidas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) segundo o método descrito por Serrano et al (2005), com adaptações. A eletroforese da primeira dimensão foi realizada em uma unidade de focalização isoeletrica Ettan IPGPhor 3 (GE Healthcare). Fitas IPG prontas (Immobiline Drystrip, GE Healthcare) de 13cm, com um gradiente de pH linear de 3-10, foram empregadas para a separação da primeira dimensão, seguindo um programa de 5 passos: 14-16 horas de reidratação com as amostras em TR, 100V durante 30 minutos, 500V durante 2 horas, um gradiente de voltagem de 500V a 8000V durante 3 horas e 8000V durante 1 hora. Antes de serem aplicadas no gel da segunda dimensão da focalização, as proteínas nas fitas IPG foram reduzidas e alquiladas por meio de incubação sequencial com solução de equilíbrio - SE (Tris-HCl pH 8,8 75mM, Uréia 6M, Glicerol 29,3%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 0,002%), 10mg/mL de DTT em SE e 25mg/mL de iodoacetamida em SE.

As fitas foram aplicadas diretamente sobre o gel de poliacrilamida-SDS (18cm x 18cm) para a segunda dimensão a 8°C, em dois passos: 30 minutos a 16mA/gel seguido por 24mA/gel até o final da corrida. Os géis foram fixados e corados com *PhastGel Blue R* (GE Healthcare Life Sciences) ou com nitrato de prata, com o kit *PlusOne Silver Staining Kit* (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante, e digitalizados em seguida em scanner de luz convencional. As análises das imagens foram realizadas com o auxílio do programa *Image Master 2D Platinum v7.0* (GE Healthcare Life Sciences).

### **3.7 Análise estatística dos dados**

Cada experimento, realizado em triplicata, foi repetido pelo menos três vezes. Foram calculados a média, erro padrão da média (EPM) e análise de variância de um caminho (ANOVA). A significância estatística foi determinada pelo teste de Dunnet, sendo considerados aceitáveis valores de  $p \leq 0.05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Ensaios celulares**

Como as CPMs C2C12 possuem a capacidade de se diferenciar em miotubos multinucleados, a morfologia das células utilizadas nos ensaios foi monitorada e documentada (figura 8) para avaliar se houve ou não diferenciação celular durante os mesmos.

A morfologia dos mioblastos não se alterou durante os ensaios, apesar de ter ocorrido morte celular no controle e em todos os tratamentos, principalmente após 72h de incubação.

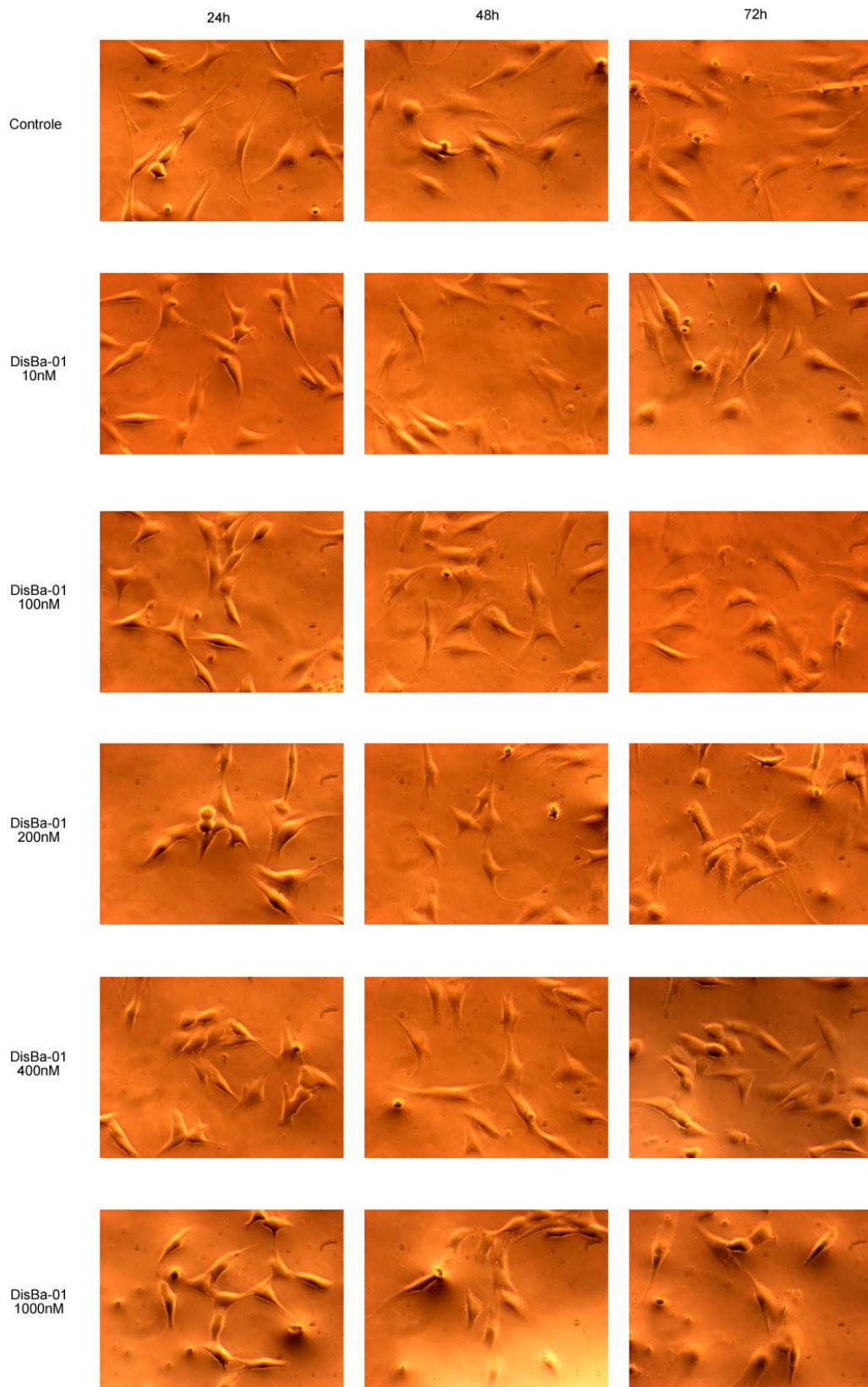


Figura 8: Morfologia dos mioblastos durante os ensaios.

#### 4.1.1 Ensaio de promoção de adesão

A adesão das células C2C12 em poços revestidos com fibronectina, colágeno tipo I, colágeno tipo III, colágeno tipo IV ou DisBa-01 em diferentes concentrações (0,1mg/mL, 1mg/ml e 5mg/mL) foi analisada (figura 9). Poços revestidos com BSA foram utilizados como controle negativo de adesão.

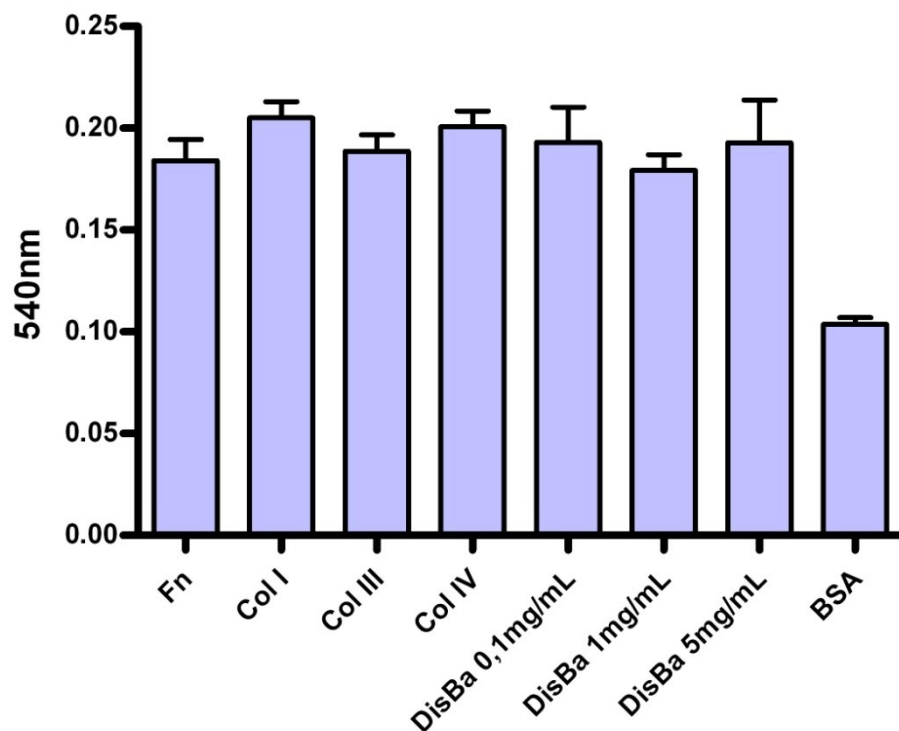


Figura 9: Adesão de mioblastos a placas de cultura recobertas com diferentes proteínas.

Fn: fibronectina; Col I: colágeno tipo I; Col III: colágeno tipo III; Col IV: colágeno tipo IV; BSA: controle negativo. Quando não indicada a concentração do “coating”, assumir 1 mg/mL. Os mioblastos se aderiram a todos os substratos imobilizados de maneira semelhante, exceto ao controle negativo (BSA), como esperado.

As células aderiram de forma similar a todos os substratos, exceto ao BSA, cuja adesão foi mais baixa como era esperado. Não houve diferença significativa entre os grupos.

#### **4.1.2 Ensaio de desadesão**

Este ensaio testou o efeito da adição de DisBa-01 solúvel sobre a desadesão das células C2C12 quando aderidas em colágeno tipo I (figura 10) ou fibronectina (figura 11). Poços revestidos com BSA foram utilizados como controle negativo de adesão (Ctrl –) em todos os ensaios. A adesão ao colágeno tipo I e à fibronectina sem adição de DisBa-01 foi considerada como 100%.

A DisBa-01 não foi capaz de desaderir os mioblastos dos poços recobertos com colágeno ou fibronectina em nenhuma concentração testada.

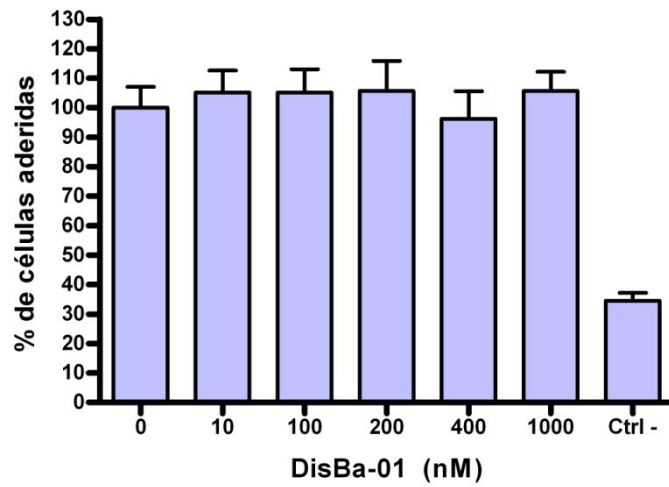


Figura 10: Porcentagem de mioblastos aderidos em placas recobertas com colágeno tipo I.

O número de células aderidas foi medido e o valor foi normalizado como porcentagem em relação ao controle (0nM – sem adição de DisBa-01). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de três experimentos em triplicata.

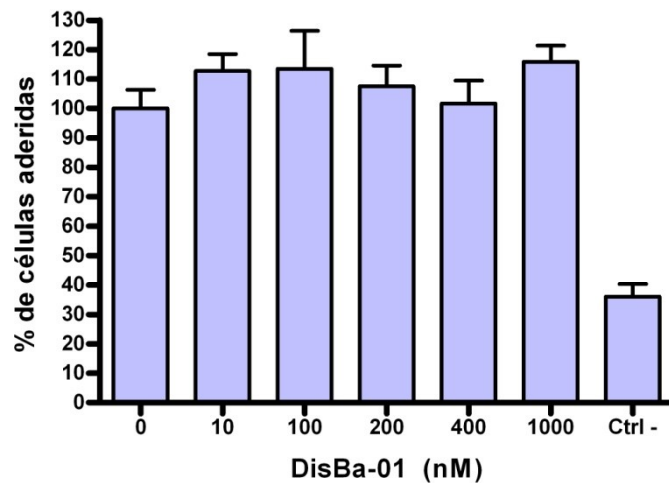


Figura 11: Porcentagem de mioblastos aderidos em placas recobertas com fibronectina.

O número de células aderidas foi medido e o valor foi normalizado como porcentagem em relação ao controle (0nM – sem adição de DisBa-01). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de três experimentos em triplicata.

A adesão aos poços recobertos com BSA sempre foi significativamente menor que aos poços recobertos com colágeno tipo I ou fibronectina, com ou sem adição de DisBa-01.

#### **4.1.3 Ensaio de inibição da adesão**

Este ensaio testou o efeito da incubação das células C2C12 com DisBa-01 solúvel sobre a adesão das mesmas em colágeno tipo I (figura 12) ou fibronectina (figura 13). Poços revestidos com BSA foram utilizados como controle negativo de adesão (Ctrl –) em todos os ensaios. A adesão ao colágeno tipo I e à fibronectina sem adição de DisBa-01 (0nM) foi considerada como 100%.

A DisBa-01 inibiu significativamente a adesão ao colágeno em todas as concentrações, de uma maneira não dose-dependente. A adesão à fibronectina não foi inibida pela adição de DisBa-01 em nenhuma concentração exceto a de 1000nM.



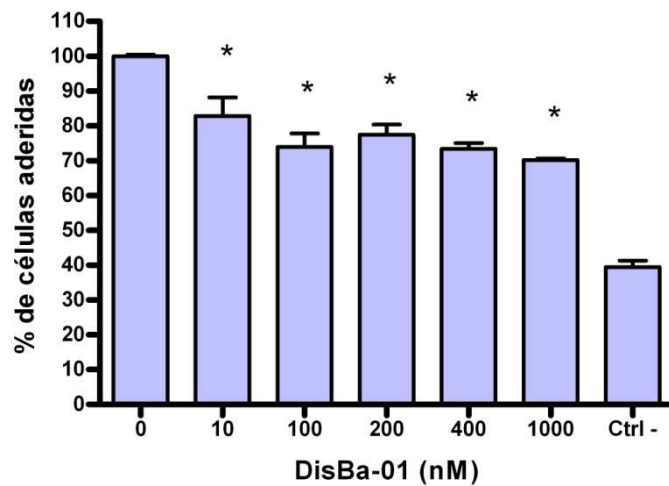


Figura 12: Porcentagem de mioblastos aderidos ao colágeno tipo I após incubação com DisBa-01.

O número de células aderidas foi medido e o valor foi normalizado como porcentagem em relação ao controle (0nM – sem adição de DisBa-01). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de três experimentos em triplicata. Houve inibição da adesão em todas as concentrações testadas (\* $p \leq 0,01$ ; ANOVA/Dunnett).

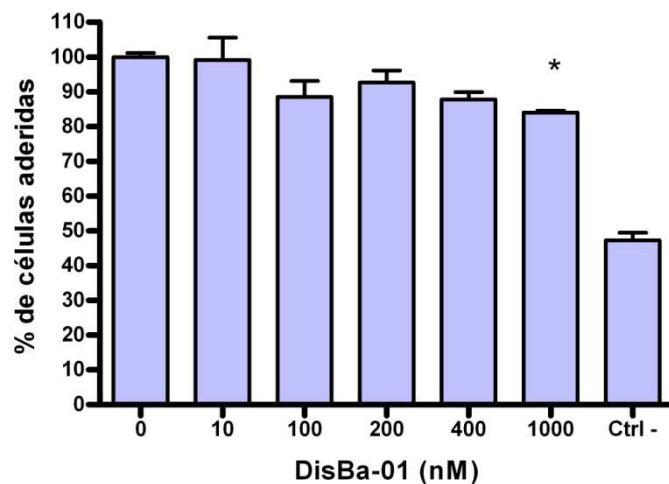


Figura 13: Porcentagem de mioblastos aderidos à fibronectina após incubação com DisBa-01

O número de células aderidas foi medido e o valor foi normalizado como porcentagem em relação ao controle (0nM – sem adição de DisBa-01). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de três experimentos em triplicata. Houve inibição da adesão na concentração de 1000nM (\* $p \leq 0,05$ ; ANOVA/Dunnett).

A adesão aos poços recobertos com BSA sempre foi significativamente menor que aos poços recobertos com colágeno tipo I ou fibronectina, com ou sem incubação com DisBa-01.

#### **4.1.4 Ensaio de proliferação celular**

As células C2C12 têm um tempo de duplicação médio de 12h quando incubadas em DMEM suplementado com 10% de SFB (Liu *et al.*, 2008; Robey *et al.*, 2008; Bardouille *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 1997). A utilização desta concentração de soro fetal bovino apresentava dois problemas: a grande quantidade de proteínas do soro em relação às outras proteínas no meio condicionado, que foi coletado para eletroforese bidimensional após os ensaios, e a rápida proliferação celular que, em testes preliminares, levou à confluência dos poços antes do término do período de incubação (dados não mostrados). Assim, foi utilizada uma concentração final de 0,5% de suplementação com SFB no meio de cultura dos ensaios de proliferação celular já que, de acordo com Liu *et al.* (2008), o tempo de duplicação celular da C2C12 sobe para aproximadamente 37h quando incubada em DMEM suplementado com 0,5% de SFB.

O efeito da adição de DisBa-01 solúvel sobre a proliferação de mioblastos foi testado em três tempos: 24, 48 e 72h (figura 14). O número de células não tratadas aderidas (controle, não mostrado no gráfico) foi considerado 0%, enquanto o número de células tratadas com diferentes concentrações de DisBa-01 solúvel que permaneceram aderidas foi normalizado em relação ao controle.

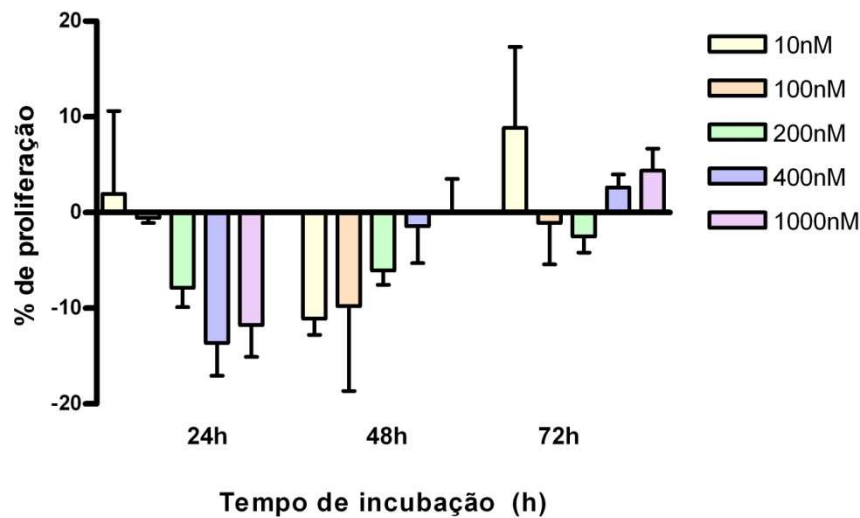


Figura 14: Proliferação de mioblastos na presença de DisBa-01 em diferentes concentrações após incubação.

O número de células aderidas foi medido após o tempo de incubação e o valor foi normalizado como porcentagem de células a mais ou a menos em relação ao controle de cada tempo de incubação (células não tratadas, não exibidas no gráfico e cujo valor foi estipulado em 0%). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de três experimentos em triplicata.

Apesar de haver uma tendência à diminuição do número de mioblastos após a adição da DisBa-01 depois de 24h e 48h de incubação, a proteína não foi capaz de inibir significativamente a proliferação celular nos tempos testados.

### 4.3 Determinação dos receptores de adesão por citometria de fluxo

As células C2C12 foram inicialmente testadas quanto a sensibilidade ao EDTA e à tripsina durante o processo de retirada das células das garrafas de cultura. Para isso, a

presença das integrinas  $\alpha_v$  e  $\beta_1$ , com marcação por FITC (excitação a 488nm), foi testada em ambos os tratamentos (figura 15). Estudos indicam a presença de ambas as integrinas em mioblastos (Dallabrida *et al.*, 2005; Epting *et al.*, 2004) e, por isso, elas foram utilizadas nesta fase inicial.

Quando utilizada a solução de tripsina 0,25% e EDTA 0,02%, as células desaderiram mais rapidamente das garrafas (aproximadamente 3 minutos). Além disso, as interações célula-célula foram desfeitas, aumentando relativamente a superfície de contato celular com os anticorpos e possibilitando uma maior interação entre estes e as integrinas em estudo (Pison *et al.*, 2006). Uma pequena quantidade de células apresentou fluorescência significativa para ambas as integrinas testadas.

Foi necessário mais tempo para a desadesão das células quando utilizado EDTA 0,2% (aproximadamente 8 minutos) e as interações célula-célula não foram totalmente desfeitas, favorecendo a formação de aglomerados celulares na suspensão e diminuindo a superfície disponível para o contato com os anticorpos. Quando tratadas com anticorpos anti- $\alpha_v$ , estas células não apresentaram fluorescência; quando utilizado anticorpo anti- $\beta_1$ , houve uma leve marcação das células, mas não foi significativa.

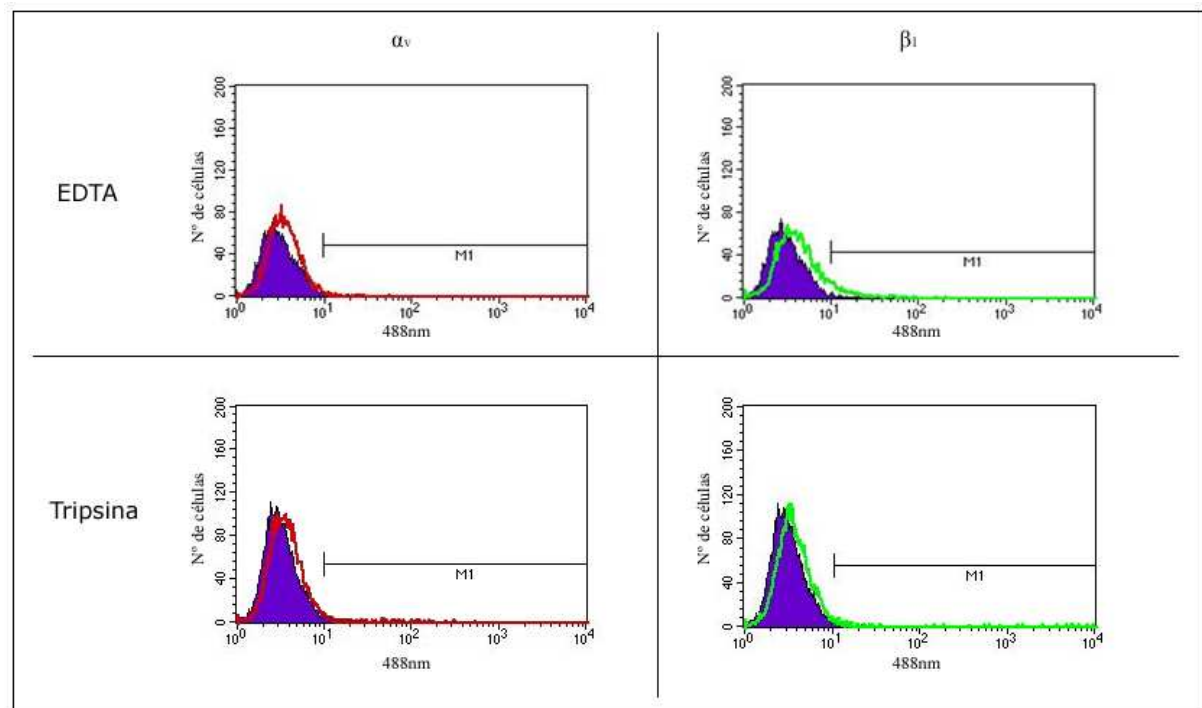


Figura 15: Histogramas das análises de células desaderidas das garrafas de cultura com EDTA ou tripsina. Não houve diferença significativa entre os controles (área roxa) e as células tratadas com anticorpos (anti- $\alpha_v$  em contorno vermelho e anti-  $\beta_1$  em contorno verde) para as células tratadas com EDTA. Quando tratadas com tripsina, uma pequena quantidade de células apresentou fluorescência para ambas as integrinas.

O tratamento com solução de tripsina e EDTA deixou as células mais separadas umas das outras, evitando a formação de aglomerados celulares (dados não mostrados) e permitindo uma contagem de células ligeiramente maior durante a análise por citometria de fluxo. As células descoladas das garrafas de cultura com EDTA 0,2% formaram aglomerados, dificultando a leitura de células únicas pelo citômetro e reduzindo a quantidade de células marcadas.

Tendo em vista estes resultados, as células utilizadas para os testes seguintes foram retiradas das garrafas de cultura com o auxílio de solução de tripsina e EDTA. Os mioblastos foram incubados com anticorpos contra as integrinas  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_4$  (figura 16).

Não houve indicação da presença de nenhuma integrina testada, exceto as integrinas  $\alpha_v$  e  $\beta_1$ , que foram marcadas em uma pequena quantidade de células.

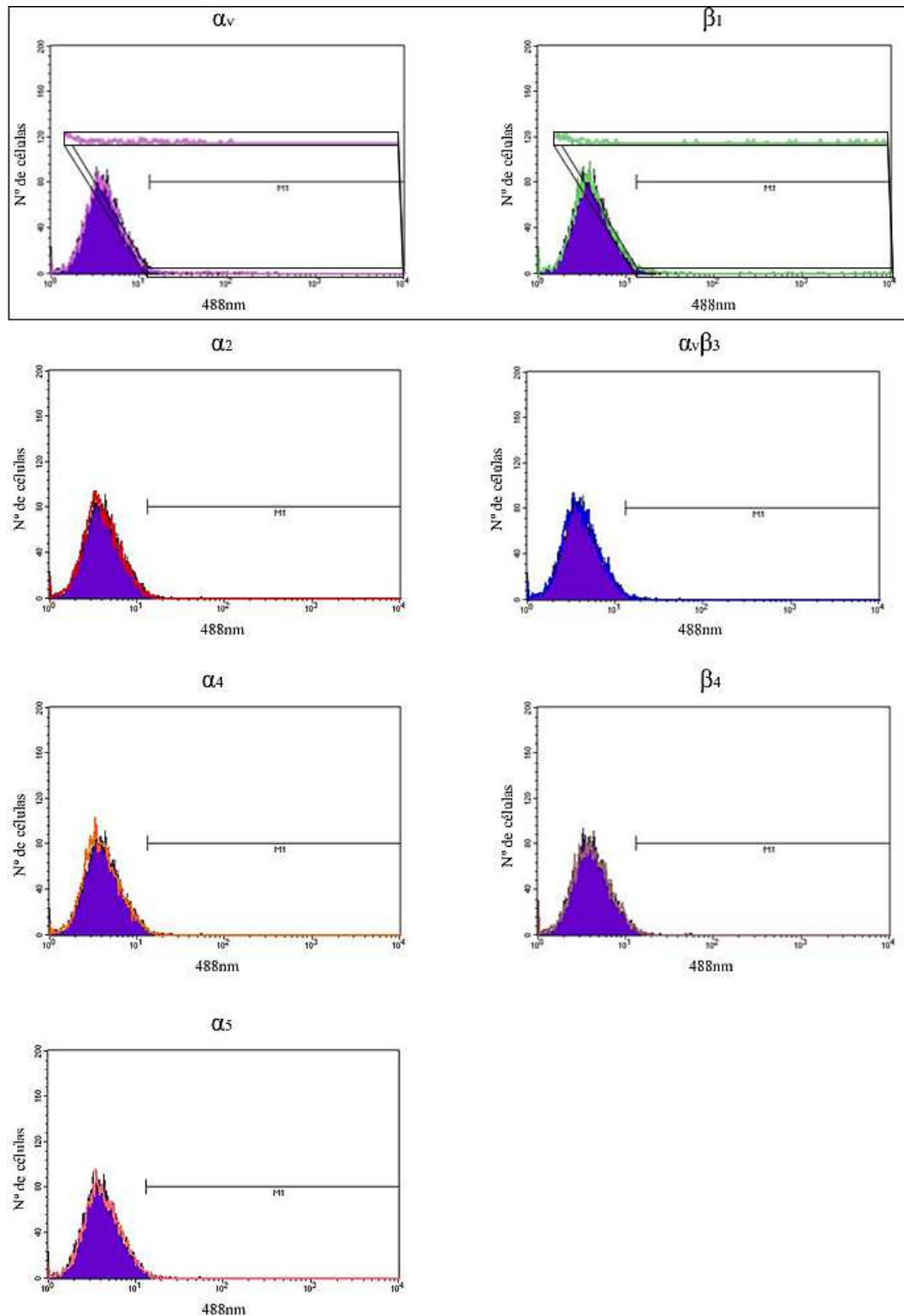


Figura 16: Histogramas das análises de células C2C12 incubadas com diferentes integrinas.

Quando incubadas com anticorpos contra as integrinas  $\alpha_v$  e  $\beta_1$ , uma pequena quantidade de células apresentou fluorescência; quando incubadas com anticorpos contra as outras integrinas testadas, não houve diferença em relação ao controle.

#### 4.4 Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional foi realizada a partir de amostras do meio condicionado dos ensaios de proliferação após 24h e 72h de incubação, na tentativa de identificar possíveis moléculas sinalizadoras que seriam secretadas em resposta ao estímulo da DisBa-01. Em cada gel foram aplicados 470µg de proteína total.

As imagens dos géis de quatro amostras de meio condicionado, dois controles e dois tratados com DisBa-01 1000nM após 24h e 72h, estão mostrados na figura 17. Por inspeção visual dos géis já foi possível notar diferenças entre os controles e os tratados, com proteínas dispersas por todas as faixas de massa molecular dos géis, mas mais concentradas nas faixas neutra e ácida de pI.

A análise realizada pelo programa *Image Master 2D Platinum v7.0* (GE Healthcare Life Sciences) mostrou que há muitas regiões similares nos géis, mas também indicou áreas com diferenças significativas (delimitadas por retângulos na figura 17). Estas regiões foram retiradas dos géis e serão analisadas por espectrometria de massas para a identificação das proteínas.

Após 24h de incubação, os géis das amostras tratadas com DisBa-01 se mostraram diferentes do gel da amostra controle (tabela 1); quando comparados entre si, quase não há diferenças. As diferenças mais visíveis, indicadas pelas setas na figura 16-B, se deram entre os géis do controle (sem adição de DisBa-01) e das células tratadas com DisBa-01 1000nM.

Após 72h de incubação, foram encontrados mais spots em ambos os géis de controle e de amostra tratada com DisBa-01 1000nM (tabela 2). As principais diferenças estão representadas por setas na figura 16-D.



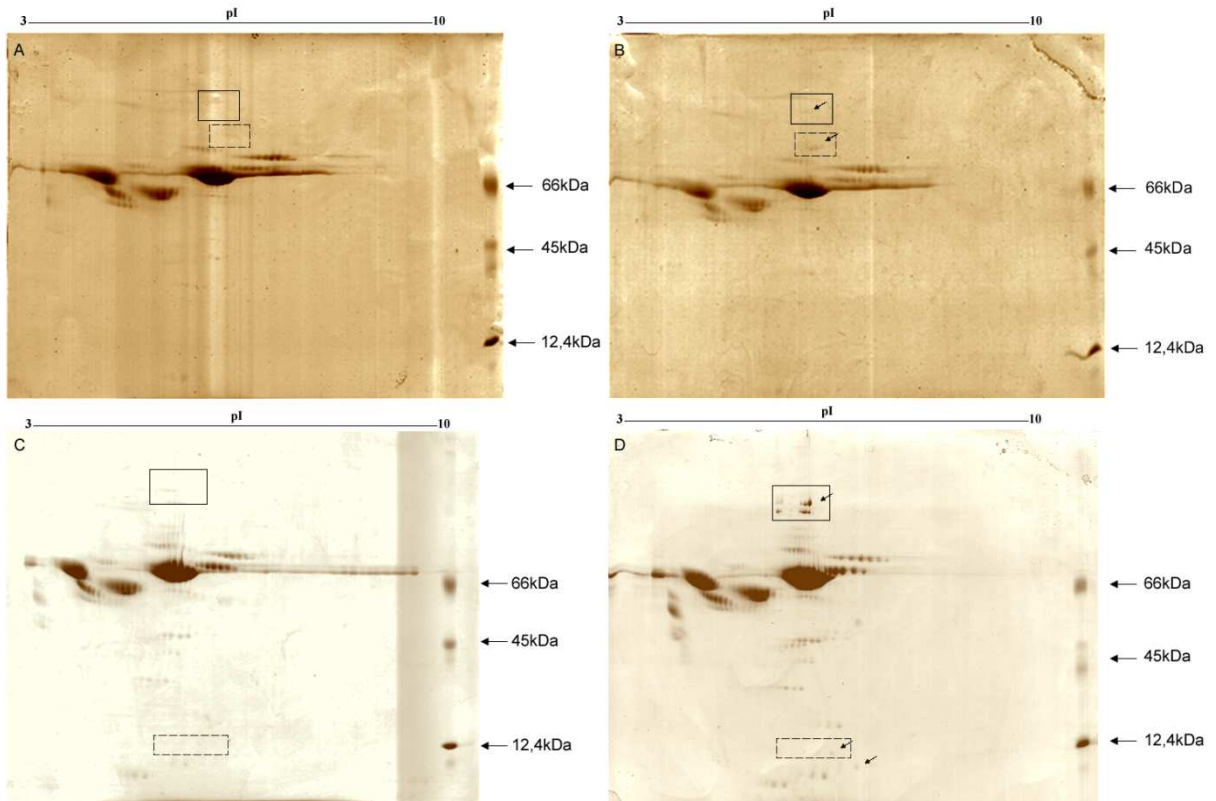


Figura 17: Eletroforese bidimensional.

A, C: Meio condicionado do controle (24h e 72h, respectivamente). B, D: Meio condicionado das células tratadas com DisBa-01 1000nM (24h e 72h, respectivamente). As setas e áreas delimitadas indicam spots ou grupo de spots encontrados nos géis B e D e que não são encontrados em A e C.

Tabela 1: Comparação entre os géis controle (sem adição de DisBa-01) e tratados com diferentes concentrações de DisBa-01 após 24h de incubação.

Nome	Nº de <i>spots</i> identificados	Pareamentos	<i>Spots</i> não pareados	% <i>Spots</i> não pareados
Controle	66	-	-	-
DisBa-01 100nM	66	56	10	15,15
DisBa-01 200nM	68	56	12	17,65
DisBa-01 400nM	67	59	8	11,94
DisBa-01 1000nM	68	55	13	19,12

Tabela 2: Comparação entre os géis controle (sem adição de DisBa-01) e tratado com DisBa-01 1000nM após 72h de incubação.

<b>Nome</b>	<b>Nº de <i>spots</i> identificados</b>	<b>Pareamentos</b>	<b><i>Spots</i> não pareados</b>	<b>% <i>Spots</i> não pareados</b>
Controle	109	-	-	-
DisBa-01 1000nM	125	87	38	30,40

## 5. DISCUSSÃO

As desintegrinas e proteínas tipo desintegrina podem ser exploradas em terapias contra doenças como Alzheimer, osteoporose, trombose e câncer (Marcinkiewicz, 2005); algumas delas deram origem a medicamentos já em uso, como o anti-agregante Aggrastat (Merck), cujo protótipo foi a echistatina (Ramos e Selistre-de-Araujo, 2006).

Atualmente, a procura por compostos específicos que possam atuar como fármacos encontra-se em expansão. Neste sentido, a DisBa-01 tem se mostrado um promissor protótipo para o desenvolvimento de fármacos, devido a sua capacidade anti-metastática, anti-angiogênica e anti-trombótica parcialmente mediada pela interação com a integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Kauskot *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2008). No entanto, em modelo de hérnia incisional *in vivo*, a DisBa-01 estimulou a angiogênese no local da hérnia (Oliveira *et al.*, dados não publicados, 2009).

Em ensaios realizados com células endoteliais não tumorais HUVECs em nosso laboratório (Pontes, dissertação de mestrado, 2006), a DisBa-01 não foi capaz de promover ou inibir a proliferação celular com a desintegrina solúvel no meio de cultura, mas inibiu a adesão da célula endotelial ao substrato e inibiu a proliferação das HUVECs quando a toxina estava imobilizada nos poços, em concentrações tão baixas quanto 1nM. Estes resultados sugerem que a DisBa-01 pode ter efeito inibitório sobre outras linhagens celulares não-tumorais.

Há um interesse muito grande em estudos sobre regeneração muscular, principalmente nas áreas médica e esportiva (Grounds *et al.*, 2002). Estudos em nosso laboratório com uma proteína tipo desintegrina com motivo ECD, a ALT-C, sugerem que esta proteína promove a

angiogênese em camundongos atímicos (Ramos *et al.*, 2007) e induz, *in vitro*, a proliferação de mioblastos em cultura primária (Mesquita-Ferrari *et al.*, 2009). Os resultados deste estudo sobre o efeito da ALT-C no processo de regeneração tecidual com cultura primária de mioblastos nos incentivou a estender este trabalho para a DisBa-01.

A linhagem de células precursoras miogênicas de camundongos C2C12 foi escolhida para este estudo por ser uma linhagem de mioblastos frequentemente utilizada, que prolifera rapidamente sob condições normais de cultura e responde bem à manipulação, com resultados reproduzíveis (Gawlitta *et al.*, 2008; Burattini *et al.*, 2004; Tannu *et al.*, 2004; Lawson e Purslow, 2000; Shimokawa *et al.*, 1998; Kubo, 1991; Yaffe e Saxel, 1977).

Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar como a DisBa-01 agiria sobre a adesão, desadesão e proliferação celular das C2C12, além de avaliar o perfil eletroforético das proteínas excretadas por estas células sob condições normais e tratadas.

O ensaio de adesão celular mostrou que as células C2C12 não demonstram preferência por nenhum dos componentes da MEC testados (fibronectina, colágenos tipo I, III e IV ou DisBa-01 imobilizados em diferentes concentrações), aderindo com a mesma afinidade a todos eles. Para os testes celulares posteriores, com DisBa-01 solúvel, foram utilizados fibronectina e colágeno tipo I imobilizados.

Os resultados mostram que, em alta concentração (1000nM), a DisBa-01 inibe significativamente a adesão de CPMs à fibronectina. Este resultado é suportado por estudos que demonstram que a DisBa-01 se liga à integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Kauskot *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2008), ligante de fibronectina, vitronectina e osteopontina, entre outros componentes da MEC (Avraamides *et al.*, 2008; Takagi, 2007; Humphries *et al.*, 2006). Além disso, já foi demonstrado que proteínas contendo o motivo RGD se ligam com alta afinidade a muitas

integrinas (Niewiarowski *et al.*, 1994; Dennis *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1987) e são capazes de bloquear competitivamente a interação integrina-ligante de várias integrinas (Saiki, 1997). Estas proteínas se ligam às subunidades  $\alpha_5$ ,  $\alpha_8$ ,  $\alpha_v$ , e  $\alpha_{IIb}$  (figura 3), totalizando 7 integrinas capazes de interagir com este motivo (Hynes, 2002).

No entanto, além de inibir a adesão de mioblastos à fibronectina, a DisBa-01 inibiu a adesão das células C2C12 ao colágeno tipo I em todas as doses testadas. Os receptores de colágeno, as integrinas  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$ ,  $\alpha_{11}\beta_1$  e  $\alpha_x\beta_2$  não fazem parte do grupo de integrinas ligantes de RGD (Humphries *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos sugerem que a ocupação de uma integrina possa suprimir a função de outras integrinas, na chamada inibição trans-dominante. A ligação à integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  de plaquetas induz a supressão trans-dominante da função das integrinas  $\alpha_5\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$  e a apoptose de células de ovário de hamster (Diaz-Gonzalez *et al.*, 1996); anticorpos anti- $\alpha_v\beta_3$  suprimem a fagocitose dependente de  $\alpha_5\beta_1$  (Blystone *et al.*, 1994) e a ligação à integrina  $\alpha_4\beta_1$  inibe a expressão de metalopeptidases dependente de  $\alpha_5\beta_1$  (Huhtala *et al.*, 1995). Essa interferência ocorre pela interrupção da sinalização mediada por integrinas, processo que envolve mudança conformacional do domínio extracelular e a presença da cauda citoplasmática da subunidade  $\beta$  da integrina ocupada. A inibição trans-dominante está diretamente relacionada às mudanças conformacionais do domínio extracelular das integrinas e pode coordenar temporal e espacialmente a sinalização de integrinas, levando a efeitos biológicos inesperados de inibidores de integrinas específicas (Diaz-Gonzalez *et al.*, 1996). No entanto, não foi possível identificar a presença das integrinas  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  ou  $\alpha_v\beta_3$  nestas células, o que sugere que a DisBa-01 possa estar se ligando a outros receptores. São necessários mais estudos para identificar quais as integrinas envolvidas no efeito da DisBa-01 nas células C2C12 e para verificar se este tipo de inibição ocorre nestas células ao serem tratadas com DisBa-01.

Outros estudos sugerem que a integrina  $\alpha_v\beta_3$  de células de musculatura lisa é capaz de se ligar a diversos componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, vitronectina, laminina e colágenos tipo I e IV (Clyman *et al.*, 1992; Charo *et al.*, 1990) e que esta integrina também se liga a fragmentos de colágeno tipo I degradado por colagenase (Stringa *et al.*, 2000; Messent *et al.*, 1998; Davis, 1992). Entretanto, como a integrina  $\alpha_v\beta_3$  não é um dos principais receptores de colágeno, isso não explica a inibição significativa da adesão ao colágeno tipo I imobilizado.

Estudos indicam a presença das integrinas  $\alpha_7\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_5$  (Dallabrida *et al.*, 2005; Epting *et al.*, 2004) e das subunidades  $\beta_1$  (Chazaud *et al.*, 2003),  $\beta_3$  (Chamberlain *et al.*, 2007),  $\beta_4$  (Seale *et al.*, 2004),  $\alpha_M$  (Seale *et al.*, 2000),  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  (Chamberlain *et al.*, 2007),  $\alpha_5$  (Mermelstein *et al.*, 2005) e  $\alpha_7$  (Cossu e Biressi, 2005; Seale *et al.*, 2004) em células precursoras miogênicas. A determinação de uma possível ocorrência de inibição trans-dominante nestas células, se a DisBa-01 realmente se liga a outras integrinas além das ligantes de RGD ou se há a ligação de integrinas  $\alpha_v\beta_3$  da C2C12 ao colágeno e se esta ligação compromete a adesão da célula a este ligante será importante para a compreensão do mecanismo de ação da DisBa-01 sobre estas células.

Além disso, as integrinas não são os únicos receptores de colágeno na superfície celular. Células de mamíferos expressam um amplo espectro de proteínas e mecanismos para o reconhecimento de colágeno ou fragmentos de colágeno: integrinas, receptores de domínio discoidina (DDR), glicoproteína VI, receptor tipo Ig associado a leucócito (LAIR) e a família de receptores de manose. Integrinas e DDRs reconhecem sequências específicas de aminoácidos, enquanto LAIR e glicoproteína VI reconhecem trechos não enovelados da tripla hélice de colágeno. Os receptores de manose são os mais promíscuos e se ligam bem a colágeno nativo e desnaturado (Leitinger e Hohenester, 2007; Popova *et al.*, 2007). O

envolvimento da DisBa-01 com outros receptores além de integrinas ainda não foi estudado. Saber se há interação desta desintegrina com outros receptores de proteínas da MEC será importante para estudos futuros.

Os outros ensaios celulares realizados não mostraram resultados significativos. Apesar de ser capaz de inibir a adesão ao colágeno tipo I e, em altas concentrações, à fibronectina, a DisBa-01 não promoveu a desadesão das células C2C12 aderidas a estas duas proteínas no tempo de incubação analisado. A adesão celular é um evento crítico em eventos celulares como proliferação, diferenciação, manutenção da integridade do tecido e metástase tumoral, entre outros, e pode ser mediada por integrinas, que conectam componentes da MEC ao citoesqueleto celular (Hynes, 2002; Hynes *et al.*, 1999). Na ausência de adesão, as células entram em processo de morte celular ou apoptose, também chamado de *anoikis*, termo que denota apoptose em células não aderidas à MEC (Meredith e Schwartz, 1997; Frisch e Francis, 1994). Apesar de testes para constatar apoptose não terem sido realizados, a DisBa-01 provavelmente não promove *anoikis* por não desaderir células já ligadas ao substrato durante a incubação no tempo analisado.

A DisBa-01 também não influencia de forma significativa na proliferação das C2C12, entretanto, esta proteína mostrou uma tendência a inibir a proliferação celular tanto em 24h de incubação (nas maiores concentrações) quanto em 48h (nas menores concentrações). A integrina  $\alpha_v\beta_3$  está envolvida em processos de migração e proliferação celular (Neri e Bicknell, 2005; Campbell *et al.*, 2003) e estudos demonstram que a utilização de moléculas ligantes de  $\alpha_v\beta_3$  (anticorpos, desintegrinas RGD, como a echistatina, e peptídeos sintéticos não-RGD) inibe a proliferação celular (Zhou *et al.*, 2004a; Maeshima *et al.*, 2000).

As células mortas não foram quantificadas, mas foi possível perceber que, após 72h de incubação, havia muitas células desaderidas ou em processo de desadesão, tanto por fotografias da microscopia óptica quanto pela existência de *pellets* visíveis contendo material sólido após centrifugação do meio condicionado. A morte celular aconteceu tanto nos poços incubados com DisBa-01 quanto nos poços controle, isso pode indicar que a utilização de meio suplementado com apenas 0,5% de SFB pode ser insuficiente para ensaios com duração maior que 48h.

A citometria de fluxo não indicou a presença de outras integrinas testadas além de  $\alpha_v$  e  $\beta_1$ . Apesar de estudos indicarem a expressão de outras integrinas neste tipo celular, há relatos de expressão diferencial de integrinas dependendo das condições de cultura celular. Sohn *et al* (2008) evidenciam que células de musculatura lisa expressam uma grande quantidade de  $\alpha_5$  e  $\beta_1$  ao serem expostas a meio de cultura sem soro, enquanto a expressão de  $\alpha_v$  aumenta quando as células são cultivadas em meio rico em fatores de crescimento. Hannafin *et al* (2006) indicam diferenças na expressão de  $\alpha_5$  e  $\beta_1$  em fibroblastos de acordo com o substrato de crescimento (plástico, colágeno, elastina, fibronectina ou laminina); quando aplicada força mecânica às células cultivadas nestes substratos, também houve expressão diferenciada de  $\alpha_5$  e  $\beta_1$ , além de haver aumento na expressão de  $\alpha_3$ . Para a análise por citometria de fluxo, foram utilizadas somente células cultivadas com DMEM suplementado com 10% de SFB diretamente sobre o plástico. No entanto, durante os ensaios celulares, foram utilizados diferentes substratos (colágeno tipo I e fibronectina). Além disso, nos ensaios de proliferação celular foi utilizado DMEM suplementado com 0,5% de SFB. Esta concentração de soro foi escolhida para minimizar a interferência das proteínas presentes no SFB durante as análises por 2DE e também para diminuir a taxa de crescimento celular das C2C12 para que o efeito da DisBa-01 sobre estas células fosse melhor acompanhado já que, de acordo com Liu *et al*.



(2008), o tempo de duplicação celular das C2C12 sobe de 12h (quando utilizado DMEM suplementado com 10% de SFB) para 37h quando a concentração de 0,5% de SFB é utilizada.

Em adição, ficou claro que, para este tipo celular, a utilização de solução contendo tripsina e EDTA para a remoção das células das garrafas de cultura promove uma melhor marcação com anticorpos, em comparação com solução de EDTA. O uso de ambas as soluções é encontrado na literatura (Young *et al.*, 2009; Liotta *et al.*, 2008; Jursik *et al.*, 2007; Ruster *et al.*, 2006) e, por esse motivo, é necessária a comparação entre ambos para a utilização do método que melhor se aplica ao estudo.

Métodos para a análise de uma grande quantidade de proteínas, em relação à presença e abundância, têm sido desenvolvidos com a ajuda de eletroforese bidimensional. É importante estar atento ao fato de que, ao comparar perfis eletroforéticos, nem todas as proteínas presentes na amostra são vistas e, portanto, parâmetros que têm influência sobre o que pode ser visualizado devem ser levados em conta: quantidade e solubilização da amostra, faixa de pI da análise, corante, entre outros (Serrano *et al.*, 2005). Por estes motivos, as fitas IPG com faixa de pI de 3-10 foram escolhidas, pois permitem a visualização de uma grande faixa de proteínas, assim como a utilização de nitrato de prata para a visualização das proteínas porque, apesar da obtenção de uniformidade de cor ser difícil, a sensibilidade do método é muito grande (na ordem de nanogramas de proteína) (Chevallet *et al.*, 2006). Entretanto, como este método de coloração pode interferir na identificação de proteínas por espectrometria de massas devido à introdução de ligações cruzadas em proteínas (Jin *et al.*, 2008), os géis destinados à remoção dos *spots* para identificação dos mesmos foram corados com comassie blue, um método menos sensível, mas mais compatível com espectrometria de massas (Chevallet *et al.*, 2006).

A análise computacional dos géis 2D mostrou que a maior parte dos *spots* são idênticos tanto nos controles quanto nos tratados. Entretanto, após 24h de incubação com DisBa-01, 12% a 19% dos *spots* nos géis das amostras incubadas com a desintegrina não foram pareados com *spots* no gel da amostra controle, indicando alteração na secreção protéica dos mioblastos tratados com DisBa-01, principalmente após incubação com a concentração mais alta testada (1000nM). Após 72 horas este efeito ficou mais evidente, com mais de 30% de *spots* não pareados entre o gel da amostra controle e o da amostra incubada com 1000nM de DisBa-01.

Há vários relatos de que desintegrinas e proteínas tipo desintegrina possam alterar a expressão gênica. A ALT-C, uma proteína tipo desintegrina, induz a expressão de VEGF em fibroblastos (Cominetti *et al.*, 2004) mas não em mioblastos (Mesquita-Ferrari *et al.*, 2009). Outros estudos com toxinas de serpentes sugerem que estas sejam capazes de induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo* (Clissa *et al.*, 2001; Petricevich *et al.*, 2000).

Ainda não foi possível determinar, pelos procedimentos utilizados neste trabalho, quais fatores ou vias poderiam estar envolvidos na sinalização intracelular de mioblastos induzida por DisBa-01. A análise dos *spots* por espectrometria de massas ainda está em andamento e deverá ser concluída em breve. Mais estudos são necessários para tentar elucidar estas questões de forma a facilitar o entendimento do mecanismo de ação da DisBa-01.

## 6. CONCLUSÕES

- A DisBa-01 promove a adesão.
- A DisBa-01 inibe a adesão de mioblastos C2C12 ao colágeno tipo I e, em altas concentrações, à fibronectina;
- A DisBa-01 não afeta a proliferação de mioblastos e tampouco causa a desadesão destes quando aderidos à fibronectina ou ao colágeno tipo I, provavelmente não causando apoptose por descolamento (*anoikis*);
- A DisBa-01 provoca uma alteração na secreção protéica das C2C12 pela diferença no padrão de expressão;
- Mais estudos são necessários para o entendimento do mecanismo de ação desta desintegrina.

## 7. REFERÊNCIAS

- Fundação Nacional de Saúde (2001). **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília, Ministério da Saúde.
- Sistema de Informação de Agravos de Notificação. "Acidente por animais peçonhentos." Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>. [Acessado em 22 de julho de 2009].
- Instituto Butantan. "Serpentes Peçonhentas." Disponível em <http://www.butantan.gov.br/portal/Ensino/Material+Did%C3%A1tico/05+-+Serpentes+Pe%C3%A7onhentas>. [Acessado em 18 de julho de 2009].
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Centro de Conservação de Répteis e Anfíbios. "Sobre as serpentes." Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/ran/>. [Acessado em 22 de julho de 2009].
- Abmayr, S. M., Balagopalan, L., Galletta, B. J. e Hong, S. J. (2003). "**Cell and molecular biology of myoblast fusion.**" *Int Rev Cytol* **225**: p. 33-89.
- Aebersold, R. e Mann, M. (2003). "**Mass spectrometry-based proteomics.**" *Nature* **422**(6928): p. 198-207.
- Amara, U., Rittirsch, D., Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F., Lambris, J. D. e Huber-Lang, M. (2008). "**Interaction between the coagulation and complement system.**" *Adv Exp Med Biol* **632**: p. 71-9.
- Anangi, R., Chen, C.-Y., Cheng, C.-H., Chen, Y.-C., Chen, C.-C., Chu, Y.-P., Chang, C.-H., Jeng, W.-Y., Shiu, J.-H. e Chuang, W.-J. (2007). "**Expression of Snake Venom Toxins in *Pichia pastoris*.**" *Toxin Reviews* **26**(2): p. 169-187.
- Anastasia, L., Papini, N., Colazzo, F., Palazzolo, G., Tringali, C., Dileo, L., Piccoli, M., Conforti, E., Sitzia, C., Monti, E., Sampaolesi, M., Tettamanti, G. e Venerando, B. (2008). "**NEU3 sialidase strictly modulates GM3 levels in skeletal myoblasts C2C12 thus favoring their differentiation and protecting them from apoptosis.**" *J Biol Chem* **283**(52): p. 36265-71.
- Anderson, N. L., Matheson, A. D. e Steiner, S. (2000). "**Proteomics: applications in basic and applied biology.**" *Curr Opin Biotechnol* **11**(4): p. 408-12.
- Appell, H. J., Forsberg, S. e Hollmann, W. (1988). "**Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neoformation.**" *Int J Sports Med* **9**(4): p. 297-9.
- Arnaut, M. A., Mahalingam, B. e Xiong, J. P. (2005). "**Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling.**" *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: p. 381-410.

- Asakura, A., Komaki, M. e Rudnicki, M. (2001). "**Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation.**" Differentiation **68**(4-5): p. 245-53.
- Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B. e Varner, J. A. (2008). "**Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis.**" Nat Rev Cancer **8**(8): p. 604-17.
- Bardouille, C., Lehmann, J., Heimann, P. e Jockusch, H. (2001). "**Growth and differentiation of permanent and secondary mouse myogenic cell lines on microcarriers.**" Appl Microbiol Biotechnol **55**(5): p. 556-62.
- Bauer, M., Sun, Y., Degenhardt, C. e Kozikowski, B. (1993). "**Assignment of all four disulfide bridges in echistatin.**" J Protein Chem **12**(6): p. 759-64.
- Bazaa, A., Juarez, P., Marrakchi, N., Bel Lasfer, Z., El Ayeb, M., Harrison, R. A., Calvete, J. J. e Sanz, L. (2007). "**Loss of introns along the evolutionary diversification pathway of snake venom disintegrins evidenced by sequence analysis of genomic DNA from *Macrovipera lebetina transmediterranea* and *Echis ocellatus*.**" J Mol Evol **64**(2): p. 261-71.
- Berger, M., Pinto, A. F. M. e Guimarães, J. A. (2008). "**Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom.**" Toxicon **51**(4): p. 488-501.
- Beviglia, L., Stewart, G. J. e Niewiarowski, S. (1995). "**Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model.**" Oncol Res **7**(1): p. 7-20.
- Bischoff, R. e Heintz, C. (1994). "**Enhancement of skeletal muscle regeneration.**" Dev Dyn **201**(1): p. 41-54.
- Bjarnason, J. B. e Fox, J. W. (1994). "**Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms.**" Pharmacol Ther **62**(3): p. 325-72.
- Blanco-Bose, W. E., Yao, C. C., Kramer, R. H. e Blau, H. M. (2001). "**Purification of mouse primary myoblasts based on alpha 7 integrin expression.**" Exp Cell Res **265**(2): p. 212-20.
- Blau, H. M., Chiu, C. P., Pavlath, G. K. e Webster, C. (1985). "**Muscle gene expression in heterokaryons.**" Adv Exp Med Biol **182**: p. 231-47.
- Blystone, S. D., Graham, I. L., Lindberg, F. P. e Brown, E. J. (1994). "**Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1.**" J Cell Biol **127**(4): p. 1129-37.
- Boelens, J. J., Wynn, R. F., O'Meara, A., Veys, P., Bertrand, Y., Souillet, G., Wraith, J. E., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., Sykora, K. W., Sedlacek, P., Rovelli, A.,

- Uiterwaal, C. S. e Wulffraat, N. (2007). "**Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation for Hurler's syndrome in Europe: a risk factor analysis for graft failure.**" Bone Marrow Transplant **40**(3): p. 225-33.
- Boldrin, L. e Morgan, J. E. (2007). "**Activating muscle stem cells: therapeutic potential in muscle diseases.**" Curr Opin Neurol **20**(5): p. 577-82.
- Braud, S., Bon, C. e Wisner, A. (2000). "**Snake venom proteins acting on hemostasis.**" Biochimie **82**(9-10): p. 851-9.
- Brooks, P. C. (1996). "**Role of integrins in angiogenesis.**" Eur J Cancer **32A**(14): p. 2423-9.
- Brzoska, E., Bello, V., Darribere, T. e Moraczewski, J. (2006). "**Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro.**" Differentiation **74**(2-3): p. 105-18.
- Burattini, S., Ferri, P., Battistelli, M., Curci, R., Luchetti, F. e Falcieri, E. (2004). "**C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization.**" Eur J Histochem **48**(3): p. 223-33.
- Burke, R. D. (1999). "**Invertebrate integrins: structure, function, and evolution.**" Int Rev Cytol **191**: p. 257-84.
- Burkin, D. J., Wallace, G. Q., Milner, D. J., Chaney, E. J., Mulligan, J. A. e Kaufman, S. J. (2005). "**Transgenic expression of {alpha}7{beta}1 integrin maintains muscle integrity, increases regenerative capacity, promotes hypertrophy, and reduces cardiomyopathy in dystrophic mice.**" Am J Pathol **166**(1): p. 253-63.
- Cadle, R. e Biesecker, B. B. (1987). "**Genetic counseling in eastern Kentucky.**" Birth Defects Orig Artic Ser **23**(6): p. 258-61.
- Calvete, J. J., McLane, M. A., Stewart, G. J. e Niewiarowski, S. (1994). "**Characterization of the cross-linking site of disintegrins albolabrin, bitistatin, echistatin, and eristostatin on isolated human platelet integrin GPIIb/IIIa.**" Biochem Biophys Res Commun **202**(1): p. 135-40.
- Calvete, J. J., Moreno-Murciano, M. P., Sanz, L., Jurgens, M., Schrader, M., Raida, M., Benjamin, D. C. e Fox, J. W. (2000). "**The disulfide bond pattern of catrocollastatin C, a disintegrin-like/cysteine-rich protein isolated from *Crotalus atrox* venom.**" Protein Sci **9**(7): p. 1365-73.
- Calvete, J. J., Moreno-Murciano, M. P., Theakston, R. D., Kisiel, D. G. e Marcinkiewicz, C. (2003). "**Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering.**" Biochem J **372**(Pt 3): p. 725-34.
- Calvete, J. J., Schafer, W., Mann, K., Henschen, A. e Gonzalez-Rodriguez, J. (1992). "**Localization of the cross-linking sites of RGD and KQAGDV peptides to the**

- isolated fibrinogen receptor, the human platelet integrin glycoprotein IIb/IIIa. Influence of peptide length.** *Eur J Biochem* **206**(3): p. 759-65.
- Calvete, J. J., Schrader, M., Raida, M., McLane, M. A., Romero, A. e Niewiarowski, S. (1997). **"The disulphide bond pattern of bitistatin, a disintegrin isolated from the venom of the viper Bitis arietans."** *FEBS Lett* **416**(2): p. 197-202.
- Campbell, S., Otis, M., Cote, M., Gallo-Payet, N. e Payet, M. D. (2003). **"Connection between integrins and cell activation in rat adrenal glomerulosa cells: a role for Arg-Gly-Asp peptide in the activation of the p42/p44(mapk) pathway and intracellular calcium."** *Endocrinology* **144**(4): p. 1486-95.
- Cao, Y., Zhao, Z., Gruszczynska-Biegala, J. e Zolkiewska, A. (2003). **"Role of metalloprotease disintegrin ADAM12 in determination of quiescent reserve cells during myogenic differentiation in vitro."** *Mol Cell Biol* **23**(19): p. 6725-38.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. e Middleton, J. (2007). **"Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing."** *Stem Cells* **25**(11): p. 2739-49.
- Chang, C. e Werb, Z. (2001). **"The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis."** *Trends Cell Biol* **11**(11): p. S37-43.
- Charge, S. B. e Rudnicki, M. A. (2004). **"Cellular and molecular regulation of muscle regeneration."** *Physiol Rev* **84**(1): p. 209-38.
- Charo, I. F., Nannizzi, L., Smith, J. W. e Cheresch, D. A. (1990). **"The vitronectin receptor alpha v beta 3 binds fibronectin and acts in concert with alpha 5 beta 1 in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin."** *J Cell Biol* **111**(6 Pt 1): p. 2795-800.
- Chazaud, B., Hittinger, L., Sonnet, C., Champagne, S., Le Corvoisier, P., Benhaiem-Sigaux, N., Unterseh, T., Su, J., Merlet, P., Rahmouni, A., Garot, J., Gherardi, R. e Teiger, E. (2003). **"Endoventricular porcine autologous myoblast transplantation can be successfully achieved with minor mechanical cell damage."** *Cardiovasc Res* **58**(2): p. 444-50.
- Chen, H. e Lo, S. H. (2003). **"Regulation of tensin-promoted cell migration by its focal adhesion binding and Src homology domain 2."** *Biochem J* **370**(Pt 3): p. 1039-45.
- Chen, X., Mao, Z., Liu, S., Liu, H., Wang, X., Wu, H., Wu, Y., Zhao, T., Fan, W., Li, Y., Yew, D. T., Kindler, P. M., Li, L., He, Q., Qian, L., Wang, X. e Fan, M. (2005). **"Dedifferentiation of adult human myoblasts induced by ciliary neurotrophic factor in vitro."** *Mol Biol Cell* **16**(7): p. 3140-51.
- Cheng, Y., Meng, Q., Wang, W. e Wang, J. (2002). **"Structure-function relationship of three neurotoxins from the venom of Naja kaouthia: a comparison between the**

- NMR-derived structure of NT2 with its homologues, NT1 and NT3." Biochim Biophys Acta 1594(2): p. 353-63.**
- Chevallet, M., Luche, S. e Rabilloud, T. (2006). **"Silver staining of proteins in polyacrylamide gels."** Nat Protoc 1(4): p. 1852-8.
- Clissa, P. B., Laing, G. D., Theakston, R. D., Mota, I., Taylor, M. J. e Moura-da-Silva, A. M. (2001). **"The effect of jararhagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells."** Toxicon 39(10): p. 1567-73.
- Clyman, R. I., Mauray, F. e Kramer, R. H. (1992). **"Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix."** Exp Cell Res 200(2): p. 272-84.
- Coelho, A. L., De Freitas, M. S., Mariano-Oliveira, A., Oliveira-Carvalho, A. L., Zingali, R. B. e Barja-Fidalgo, C. (2001). **"Interaction of disintegrins with human neutrophils induces cytoskeleton reorganization, focal adhesion kinase activation, and extracellular-regulated kinase-2 nuclear translocation, interfering with the chemotactic function."** Faseb J 15(9): p. 1643-5.
- Coelho, A. L., De Freitas, M. S., Mariano-Oliveira, A., Rapozo, D. C., Pinto, L. F., Niewiarowski, S., Zingali, R. B., Marcinkiewicz, C. e Barja-Fidalgo, C. (2004). **"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 292(2): p. 371-84.
- Coelho, A. L., de Freitas, M. S., Oliveira-Carvalho, A. L., Moura-Neto, V., Zingali, R. B. e Barja-Fidalgo, C. (1999). **"Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics."** Exp Cell Res 251(2): p. 379-87.
- Cominetti, M. R., Terruggi, C. H., Ramos, O. H., Fox, J. W., Mariano-Oliveira, A., De Freitas, M. S., Figueiredo, C. C., Morandi, V. e Selistre-de-Araujo, H. S. (2004). **"Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro."** J Biol Chem 279(18): p. 18247-55.
- Cossu, G. e Biressi, S. (2005). **"Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration."** Semin Cell Dev Biol 16(4-5): p. 623-31.
- Cowan, C. A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J. P., Wang, S., Morton, C. C., McMahon, A. P., Powers, D. e Melton, D. A. (2004). **"Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts."** N Engl J Med 350(13): p. 1353-6.



- Curran, S. e Murray, G. I. (2000). **"Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis."** Eur J Cancer **36**(13 Spec No): p. 1621-30.
- Dallabrida, S. M., Ismail, N., Oberle, J. R., Himes, B. E. e Rupnick, M. A. (2005). **"Angiopoietin-1 promotes cardiac and skeletal myocyte survival through integrins."** Circ Res **96**(4): p. e8-24.
- Danen, E. H., Marcinkiewicz, C., Cornelissen, I. M., van Kraats, A. A., Pachter, J. A., Ruiter, D. J., Niewiarowski, S. e van Muijen, G. N. (1998). **"The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells."** Exp Cell Res **238**(1): p. 188-96.
- Davis, G. E. (1992). **"Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites."** Biochem Biophys Res Commun **182**(3): p. 1025-31.
- de Roodt, A. R., Litwin, S. e Vidal, J. C. (2003). **"Hemorrhagic activity of Bothrops venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality."** Toxicon **41**(8): p. 949-58.
- DeClerck, Y. A. (2000). **"Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer."** Eur J Cancer **36**(10): p. 1258-68.
- Dejosez, M., Krumenacker, J. S., Zitur, L. J., Passeri, M., Chu, L. F., Songyang, Z., Thomson, J. A. e Zwaka, T. P. (2008). **"Ronin is essential for embryogenesis and the pluripotency of mouse embryonic stem cells."** Cell **133**(7): p. 1162-74.
- Dennis, M. S., Henzel, W. J., Pitti, R. M., Lipari, M. T., Napier, M. A., Deisher, T. A., Bunting, S. e Lazarus, R. A. (1990). **"Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venoms: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors."** Proc Natl Acad Sci U S A **87**(7): p. 2471-5.
- Diaz-Gonzalez, F., Forsyth, J., Steiner, B. e Ginsberg, M. H. (1996). **"Trans-dominant inhibition of integrin function."** Mol Biol Cell **7**(12): p. 1939-51.
- Doberstein, S. K., Fetter, R. D., Mehta, A. Y. e Goodman, C. S. (1997). **"Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex."** J Cell Biol **136**(6): p. 1249-61.
- Durigan, J. L., Peviani, S. M., Russo, T. L., Delfino, G. B., Ribeiro, J. U., Cominetti, M. R., Selistre-de-Araujo, H. S. e Salvini, T. F. (2008). **"Effects of alternagin-C from Bothrops alternatus on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle."** Toxicon **52**(6): p. 687-94.
- Eberli, D., Soker, S., Atala, A. e Yoo, J. J. (2009). **"Optimization of human skeletal muscle precursor cell culture and myofiber formation in vitro."** Methods **47**(2): p. 98-103.

- Elkington, P. T. e Friedland, J. S. (2006). "**Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology.**" *Thorax* **61**(3): p. 259-66.
- Epting, C. L., Lopez, J. E., Shen, X., Liu, L., Bristow, J. e Bernstein, H. S. (2004). "**Stem cell antigen-1 is necessary for cell-cycle withdrawal and myoblast differentiation in C2C12 cells.**" *J Cell Sci* **117**(Pt 25): p. 6185-95.
- Evans, M. J. e Kaufman, M. H. (1981). "**Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.**" *Nature* **292**(5819): p. 154-6.
- Fiorani Celedon, P. A., de Andrade, A., Meireles, K. G., Gallo de Carvalho, M. C., Caldas, D. G., Moon, D. H., Carneiro, R. T., Franceschini, L. M., Oda, S. e Labate, C. A. (2007). "**Proteomic analysis of the cambial region in juvenile Eucalyptus grandis at three ages.**" *Proteomics* **7**(13): p. 2258-74.
- Fox, J. W. e Serrano, S. M. (2008a). "**Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures.**" *Proteomics* **8**(4): p. 909-20.
- Fox, J. W. e Serrano, S. M. (2008b). "**Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity.**" *Febs J* **275**(12): p. 3016-30.
- Frisch, S. M. e Francis, H. (1994). "**Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis.**" *J Cell Biol* **124**(4): p. 619-26.
- Gallagher, P., Bao, Y., Serrano, S. M., Laing, G. D., Theakston, R. D., Gutierrez, J. M., Escalante, T., Zigrino, P., Moura-da-Silva, A. M., Nischt, R., Mauch, C., Moskaluk, C. e Fox, J. W. (2005). "**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* **441**(1): p. 1-15.
- Gawlitta, D., Boonen, K. J., Oomens, C. W., Baaijens, F. P. e Bouten, C. V. (2008). "**The influence of serum-free culture conditions on skeletal muscle differentiation in a tissue-engineered model.**" *Tissue Eng Part A* **14**(1): p. 161-71.
- Gay, C. C., Leiva, L. C., Marunak, S., Teibler, P. e Acosta de Perez, O. (2005). "**Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from Bothrops alternatus venom.**" *Toxicon* **46**(5): p. 546-54.
- Giancotti, F. G. (2000). "**Complexity and specificity of integrin signalling.**" *Nat Cell Biol* **2**(1): p. E13-4.
- Gould, R. J., Polokoff, M. A., Friedman, P. A., Huang, T. F., Holt, J. C., Cook, J. J. e Niewiarowski, S. (1990). "**Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms.**" *Proc Soc Exp Biol Med* **195**(2): p. 168-71.

- Grounds, M. D., White, J. D., Rosenthal, N. e Bogoyevitch, M. A. (2002). "**The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair.**" J Histochem Cytochem **50**(5): p. 589-610.
- Grounds, M. D. e Yablonka-Reuveni, Z. (1993). "**Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration.**" Mol Cell Biol Hum Dis Ser **3**: p. 210-56.
- Guerreiro, N., Redmond, J. W., Rolfe, B. G. e Djordjevic, M. A. (1997). "**New Rhizobium leguminosarum flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins.**" Mol Plant Microbe Interact **10**(4): p. 506-16.
- Guimaraes, A. Q., Cruz-Hofling, M. A., Ferreira de Araujo, P. M., Bon, C. e Lobo de Araujo, A. (2004). "**Pharmacological and histopathological characterization of Bothrops lanceolatus (Fer de lance) venom-induced edema.**" Inflamm Res **53**(7): p. 284-91.
- Guo, W. e Giancotti, F. G. (2004). "**Integrin signalling during tumour progression.**" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): p. 816-26.
- Gutierrez, J. M., Theakston, R. D. e Warrell, D. A. (2006). "**Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership.**" PLoS Med **3**(6): p. e150.
- Hauck, C. R. (2002). "**Cell adhesion receptors – signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens.**" Med Microbiol Immunol **191**: p. 55–62.
- Hawke, T. J. e Garry, D. J. (2001). "**Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology.**" J Appl Physiol **91**(2): p. 534-51.
- Hitomi, K., Murase, M., Kawamura, T. e Maki, M. (2000). "**Constant expression of mouse calpastatin isoforms during differentiation in myoblast cell line, C2C12.**" Cytotechnology **33**(1-3): p. 63-70.
- Holterman, C. E. e Rudnicki, M. A. (2005). "**Molecular regulation of satellite cell function.**" Semin Cell Dev Biol **16**(4-5): p. 575-84.
- Hong, S. Y., Lee, H., You, W. K., Chung, K. H., Kim, D. S. e Song, K. (2003). "**The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells.**" Biochem Biophys Res Commun **302**(3): p. 502-8.
- Huang, T. F., Holt, J. C., Lukasiewicz, H. e Niewiarowski, S. (1987). "**Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex.**" J Biol Chem **262**(33): p. 16157-63.
- Hughes, A. L. (2001). "**Evolution of the integrin alpha and beta protein families.**" J Mol Evol **52**(1): p. 63-72.

- Huhtala, P., Humphries, M. J., McCarthy, J. B., Tremble, P. M., Werb, Z. e Damsky, C. H. (1995). "**Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin.**" J Cell Biol **129**(3): p. 867-79.
- Humphries, J. D., Byron, A. e Humphries, M. J. (2006). "**Integrin ligands at a glance.**" J Cell Sci **119**(Pt 19): p. 3901-3.
- Hynes, R. O. (2002). "**Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.**" Cell **110**(6): p. 673-87.
- Hynes, R. O., Bader, B. L. e Hodivala-Dilke, K. (1999). "**Integrins in vascular development.**" Braz J Med Biol Res **32**(5): p. 501-10.
- Hynes, R. O., Schwarzbauer, J. E. e Tamkun, J. W. (1987). "**Isolation and analysis of cDNA and genomic clones of fibronectin and its receptor.**" Methods Enzymol **144**: p. 447-63.
- Ivaska, J., Kapyla, J., Pentikainen, O., Hoffren, A. M., Hermonen, J., Huttunen, P., Johnson, M. S. e Heino, J. (1999). "**A peptide inhibiting the collagen binding function of integrin alpha2I domain.**" J Biol Chem **274**(6): p. 3513-21.
- Jang, Y. J., Kim, D. S., Jeon, O. H. e Kim, D. S. (2007). "**Saxatilin suppresses tumor-induced angiogenesis by regulating VEGF expression in NCI-H460 human lung cancer cells.**" J Biochem Mol Biol **40**(3): p. 439-43.
- Jansen, K. M. e Pavlath, G. K. (2006). "**Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth.**" J Cell Biol **174**(3): p. 403-13.
- Ji, Z. X., Du, C., Wu, G. S., Li, S. Y., An, G. S., Yang, Y. X., Jia, R., Jia, H. T. e Ni, J. H. (2009). "**Synergistic up-regulation of muscle LIM protein expression in C2C12 and NIH3T3 cells by myogenin and MEF2C.**" Mol Genet Genomics **281**(1): p. 1-10.
- Jia, L. G., Shimokawa, K., Bjarnason, J. B. e Fox, J. W. (1996). "**Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins.**" Toxicon **34**(11-12): p. 1269-76.
- Jin, L. T., Li, X. K., Cong, W. T., Hwang, S. Y. e Choi, J. K. (2008). "**Previsible silver staining of protein in electrophoresis gels with mass spectrometry compatibility.**" Anal Biochem **383**(2): p. 137-43.
- Juarez, P., Comas, I., Gonzalez-Candelas, F. e Calvete, J. J. (2008). "**Evolution of snake venom disintegrins by positive Darwinian selection.**" Mol Biol Evol **25**(11): p. 2391-407.
- Jursik, C., Sluyter, R., Georgiou, J. G., Fuller, S. J., Wiley, J. S. e Gu, B. J. (2007). "**A quantitative method for routine measurement of cell surface P2X7 receptor**

- function in leucocyte subsets by two-colour time-resolved flow cytometry." J Immunol Methods 325(1-2): p. 67-77.**
- Kang, I. C., Kim, D. S., Jang, Y. e Chung, K. H. (2000). "**Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis.**" Biochem Biophys Res Commun 275(1): p. 169-73.
- Karalliedde, L. (1995). "**Animal toxins.**" Br J Anaesth 74(3): p. 319-27.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A. e Suda, T. (1994). "**Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage.**" J Cell Biol 127(6 Pt 1): p. 1755-66.
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W. M., Hidalgo, A., Peired, A. J., Thomas, S. A. e Frenette, P. S. (2006). "**Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow.**" Cell 124(2): p. 407-21.
- Kauskot, A., Cominetti, M. R., Ramos, O. H., Bechyne, I., Renard, J. M., Hoylaerts, M. F., Crepin, M., Legrand, C., Selistre-de-Araujo, H. S. e Bonnefoy, A. (2008). "**Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from Bothrops alternatus.**" Front Biosci 13: p. 6604-16.
- Keogh, J. S., Shine, R. e Donnellan, S. (1998). "**Phylogenetic relationships of terrestrial Australo-Papuan elapid snakes (subfamily Hydrophiinae) based on cytochrome b and 16S rRNA sequences.**" Mol Phylogenet Evol 10(1): p. 67-81.
- Kishimoto, M. e Takahashi, T. (2002). "**Molecular cloning of HR1a and HR1b, high molecular hemorrhagic factors, from Trimeresurus flavoviridis venom.**" Toxicon 40(9): p. 1369-75.
- Koh, D. C., Armugam, A. e Jeyaseelan, K. (2006). "**Snake venom components and their applications in biomedicine.**" Cell Mol Life Sci 63(24): p. 3030-41.
- Koh, G. Y., Klug, M. G., Soonpaa, M. H. e Field, L. J. (1993). "**Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart.**" J Clin Invest 92(3): p. 1548-54.
- Kubo, Y. (1991). "**Comparison of initial stages of muscle differentiation in rat and mouse myoblastic and mouse mesodermal stem cell lines.**" J Physiol 442: p. 743-59.
- Kuramitsu, Y. e Nakamura, K. (2005). "**Current progress in proteomic study of hepatitis C virus-related human hepatocellular carcinoma.**" Expert Rev Proteomics 2(4): p. 589-601.
- Lafuste, P., Sonnet, C., Chazaud, B., Dreyfus, P. A., Gherardi, R. K., Wewer, U. M. e Authier, F. J. (2005). "**ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation.**" Mol Biol Cell 16(2): p. 861-70.

- Lan, M. A., Gersbach, C. A., Michael, K. E., Keselowsky, B. G. e Garcia, A. J. (2005). **"Myoblast proliferation and differentiation on fibronectin-coated self assembled monolayers presenting different surface chemistries."** Biomaterials **26**(22): p. 4523-31.
- Larghero, J., Vija, L., Lecourt, S., Michel, L., Verrecchia, F. e Farge, D. (2009). **"[Mesenchymal stem cells and immunomodulation: toward new immunosuppressive strategies for the treatment of autoimmune diseases?]."** Rev Med Interne **30**(3): p. 287-99.
- Lawson, M. A. e Purslow, P. P. (2000). **"Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific."** Cells Tissues Organs **167**(2-3): p. 130-7.
- Lees, S. J., Rathbone, C. R. e Booth, F. W. (2006). **"Age-associated decrease in muscle precursor cell differentiation."** Am J Physiol Cell Physiol **290**(2): p. C609-15.
- Leitinger, B. e Hohenester, E. (2007). **"Mammalian collagen receptors."** Matrix Biol **26**(3): p. 146-55.
- Lewis, R. J. e Garcia, M. L. (2003). **"Therapeutic potential of venom peptides."** Nat Rev Drug Discov **2**(10): p. 790-802.
- Liotta, F., Angeli, R., Cosmi, L., Fili, L., Manuelli, C., Frosali, F., Mazzinghi, B., Maggi, L., Pasini, A., Lisi, V., Santarlasci, V., Consoloni, L., Angelotti, M. L., Romagnani, P., Parronchi, P., Krampera, M., Maggi, E., Romagnani, S. e Annunziato, F. (2008). **"Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling."** Stem Cells **26**(1): p. 279-89.
- Liu, J., Burkin, D. J. e Kaufman, S. J. (2008). **"Increasing alpha 7 beta 1-integrin promotes muscle cell proliferation, adhesion, and resistance to apoptosis without changing gene expression."** Am J Physiol Cell Physiol **294**(2): p. C627-40.
- Loftus, J. C., Smith, J. W. e Ginsberg, M. H. (1994). **"Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face."** J Biol Chem **269**(41): p. 25235-8.
- Lopez, J. L. (2007). **"Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis."** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **849**(1-2): p. 190-202.
- Lu, Q., Clemetson, J. M. e Clemetson, K. J. (2005). **"Snake venoms and hemostasis."** J Thromb Haemost **3**(8): p. 1791-9.
- Maeshima, Y., Colorado, P. C. e Kalluri, R. (2000). **"Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties."** J Biol Chem **275**(31): p. 23745-50.

- Marcinkiewicz, C. (2005). **"Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication."** Curr Pharm Des **11**(7): p. 815-27.
- Mariano-Oliveira, A., Coelho, A. L., Terruggi, C. H., Selistre-de-Araujo, H. S., Barja-Fidalgo, C. e De Freitas, M. S. (2003). **"Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling."** Eur J Biochem **270**(24): p. 4799-808.
- Marsh, N. e Williams, V. (2005). **"Practical applications of snake venom toxins in haemostasis."** Toxicon **45**(8): p. 1171-81.
- Martin, G. R. (1981). **"Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells."** Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): p. 7634-8.
- Maruyama, M., Sugiki, M., Anai, K. e Yoshida, E. (2002). **"N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from Bothrops jararaca venom."** Toxicon **40**(8): p. 1223-226.
- Matsui, T., Fujimura, Y. e Titani, K. (2000). **"Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis."** Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): p. 146-56.
- Mauro, A. (1961). **"Satellite cell of skeletal muscle fibers."** J Biophys Biochem Cytol **9**: p. 493-5.
- Mayer, U. (2003). **"Integrins: redundant or important players in skeletal muscle?"** J Biol Chem **278**(17): p. 14587-90.
- (2003). **Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- McLane, M. A., Marcinkiewicz, C., Vijay-Kumar, S., Wierzbicka-Patynowski, I. e Niewiarowski, S. (1998). **"Viper venom disintegrins and related molecules."** Proc Soc Exp Biol Med **219**(2): p. 109-19.
- McLane, M. A., Sanchez, E. E., Wong, A., Paquette-Straub, C. e Perez, J. C. (2004). **"Disintegrins."** Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord **4**(4): p. 327-55.
- Melgarejo, A. (2003). Serpentes Peçonhentas do Brasil. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. João Luis Costa Cardoso, Francisco Oscar de Siqueira Franca e Fan Hui Wen. São Paulo, Savier: p. 33-61.
- Menezes, M. C., Furtado, M. F., Travaglia-Cardoso, S. R., Camargo, A. C. e Serrano, S. M. (2006). **"Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen Bothrops jararaca siblings."** Toxicon **47**(3): p. 304-12.

- Meredith, J. E., Jr. e Schwartz, M. A. (1997). "**Integrins, adhesion and apoptosis.**" Trends Cell Biol **7**(4): p. 146-50.
- Mermelstein, C. S., Amaral, L. M., Rebello, M. I., Reis, J. S., Borojevic, R. e Costa, M. L. (2005). "**Changes in cell shape and desmin intermediate filament distribution are associated with down-regulation of desmin expression in C2C12 myoblasts grown in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>.**" Braz J Med Biol Res **38**(7): p. 1025-32.
- Mesquita-Ferrari, R. A., Moraes, C. K. d., Micocci, K. C. e Selistre-de-Araújo, H. S. (2009). "**ALT-C, a disintegrin-like Cys-rich protein from Bothrops alternatus, increases skeletal myoblast viability.**" J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. **15**(2): p. 325-339.
- Messent, A. J., Tuckwell, D. S., Knauper, V., Humphries, M. J., Murphy, G. e Gavrilovic, J. (1998). "**Effects of collagenase-cleavage of type I collagen on alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion.**" J Cell Sci **111** ( Pt 8): p. 1127-35.
- Minea, R., Swenson, S., Costa, F., Chen, T. C. e Markland, F. S. (2005). "**Development of a novel recombinant disintegrin, contortrostatin, as an effective anti-tumor and anti-angiogenic agent.**" Pathophysiol Haemost Thromb **34**(4-5): p. 177-83.
- Moreno-Murciano, M. P., Monleon, D., Calvete, J. J., Celda, B. e Marcinkiewicz, C. (2003). "**Amino acid sequence and homology modeling of obtustatin, a novel non-RGD-containing short disintegrin isolated from the venom of Vipera lebetina obtusa.**" Protein Sci **12**(2): p. 366-71.
- Morgan, J. E. e Partridge, T. A. (2003). "**Muscle satellite cells.**" Int J Biochem Cell Biol **35**(8): p. 1151-6.
- Naglich, J. G., Jure-Kunkel, M., Gupta, E., Fargnoli, J., Henderson, A. J., Lewin, A. C., Talbott, R., Baxter, A., Bird, J., Savopoulos, R., Wills, R., Kramer, R. A. e Trail, P. A. (2001). "**Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291.**" Cancer Res **61**(23): p. 8480-5.
- Neri, D. e Bicknell, R. (2005). "**Tumour vascular targeting.**" Nat Rev Cancer **5**(6): p. 436-46.
- Nicholas, A. W. e William, R. O. (2008). "**Mesenchymal stem cells: plasticity of differentiation.**" Experimental Dermatology **17**(10): p. 874-876.
- Niewiarowski, S., McLane, M. A., Kloczewiak, M. e Stewart, G. J. (1994). "**Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors.**" Semin Hematol **31**(4): p. 289-300.
- O'Farrell, P. H. (1975). "**High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.**" J Biol Chem **250**(10): p. 4007-21.



- Oliveira, A. K., Paes Leme, A. F., Assakura, M. T., Menezes, M. C., Zelanis, A., Tashima, A. K., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., Camargo, A. C., Fox, J. W. e Serrano, S. M. (2009). **"Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from Bothrops jararaca venom."** *Toxicon* **53**(7-8): p. 797-801.
- Oliveira, C. R., Marqueti, R. C., Cominetti, M. R., Sant'Ana, E. M., Ribeiro, J. U., Pontes, C. L. S. e Selistre-de-Araujo, H. S. (2009). **"Blocking of (alpha)v(beta)3 integrin by DisBa-01, an RGD-disintegrin, prevents the development of incisional hernia in rats."** *Am J Pathol*. Enviado para publicação.
- Paine, M. J., Desmond, H. P., Theakston, R. D. e Crampton, J. M. (1992). **"Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from Bothrops jararaca venom. Insights into the disintegrin gene family."** *J Biol Chem* **267**(32): p. 22869-76.
- Pan, G., Li, J., Zhou, Y., Zheng, H. e Pei, D. (2006). **"A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal."** *Faseb J* **20**(10): p. 1730-2.
- Pan, G. e Thomson, J. A. (2007). **"Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency."** *Cell Res* **17**(1): p. 42-9.
- Pandey, A. e Mann, M. (2000). **"Proteomics to study genes and genomes."** *Nature* **405**(6788): p. 837-46.
- Park, D., Kang, I., Kim, H., Chung, K., Kim, D. S. e Yun, Y. (1998). **"Cloning and characterization of novel disintegrins from Agkistrodon halys venom."** *Mol Cells* **8**(5): p. 578-84.
- Partridge, T. A., Morgan, J. E., Coulton, G. R., Hoffman, E. P. e Kunkel, L. M. (1989). **"Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts."** *Nature* **337**(6203): p. 176-9.
- Peault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J. P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L. M. e Huard, J. (2007). **"Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy."** *Mol Ther* **15**(5): p. 867-77.
- Petricevich, V. L., Teixeira, C. F., Tambourgi, D. V. e Gutierrez, J. M. (2000). **"Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms."** *Toxicon* **38**(9): p. 1253-66.
- Pinho, F. M. e Pereira, I. D. (2001). **"[Snake bites]."** *Rev Assoc Med Bras* **47**(1): p. 24-9.
- Pison, U., Welte, T., Giersig, M. e Groneberg, D. A. (2006). **"Nanomedicine for respiratory diseases."** *Eur J Pharmacol* **533**(1-3): p. 341-50.

- Pontes, C. L. S. (2006). **Otimização da purificação e caracterização adicional de uma desintegrina-RGD recombinante de *Bothrops alternatus* e seu efeito em células endoteliais humanas (HUVEC)**. (p. 121). Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução)
- Popova, S. N., Lundgren-Akerlund, E., Wiig, H. e Gullberg, D. (2007). **"Physiology and pathology of collagen receptors."** Acta Physiol (Oxf) **190**(3): p. 179-87.
- Porada, C. D., Zanjani, E. D. e Almeida-Porad, G. (2006). **"Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications."** Curr Stem Cell Res Ther **1**(3): p. 365-9.
- Ramos, O. H., Kauskot, A., Cominetti, M. R., Bechyne, I., Salla Pontes, C. L., Chareyre, F., Manent, J., Vassy, R., Giovannini, M., Legrand, C., Selistre-de-Araujo, H. S., Crepin, M. e Bonnefoy, A. (2008). **"A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis."** Clin Exp Metastasis **25**(1): p. 53-64.
- Ramos, O. H. e Selistre-de-Araujo, H. S. (2006). **"Snake venom metalloproteases-- structure and function of catalytic and disintegrin domains."** Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **142**(3-4): p. 328-46.
- Ramos, O. H., Terruggi, C. H., Ribeiro, J. U., Cominetti, M. R., Figueiredo, C. C., Berard, M., Crepin, M., Morandi, V. e Selistre-de-Araujo, H. S. (2007). **"Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence."** Arch Biochem Biophys **461**(1): p. 1-6.
- Robey, T. E., Saiget, M. K., Reinecke, H. e Murry, C. E. (2008). **"Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair."** J Mol Cell Cardiol **45**(4): p. 567-81.
- Roccio, M., Goumans, M. J., Sluijter, J. P. e Doevendans, P. A. (2008). **"Stem cell sources for cardiac regeneration."** Panminerva Med **50**(1): p. 19-30.
- Rosenblatt, J. D., Yong, D. e Parry, D. J. (1994). **"Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle."** Muscle Nerve **17**(6): p. 608-13.
- Rossi, F., Charlton, C. A. e Blau, H. M. (1997). **"Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation."** Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): p. 8405-10.
- Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martin, M. C., de la Fuente, R., Cigudosa, J. C., Lloyd, A. C. e Bernad, A. (2005). **"Spontaneous human adult stem cell transformation."** Cancer Res **65**(8): p. 3035-9.

- Ruegg, C. e Mariotti, A. (2003). "**Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis.**" Cell Mol Life Sci **60**(6): p. 1135-57.
- Ruoslahti, E., Noble, N. A., Kagami, S. e Border, W. A. (1994). "**Integrins.**" Kidney Int Suppl **44**: p. S17-22.
- Ruster, B., Gottig, S., Ludwig, R. J., Bistran, R., Muller, S., Seifried, E., Gille, J. e Henschler, R. (2006). "**Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells.**" Blood **108**(12): p. 3938-44.
- Saiki, I. (1997). "**Cell adhesion molecules and cancer metastasis.**" Jpn J Pharmacol **75**(3): p. 215-42.
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K. e Muneta, T. (2005). "**Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source.**" Arthritis Rheum **52**(8): p. 2521-9.
- Sant'Ana, E. M., Gouvea, C. M., Nakaie, C. R. e Selistre-de-Araujo, H. S. (2008). "**Angiogenesis and growth factor modulation induced by alternagin C, a snake venom disintegrin-like, cysteine-rich protein on a rat skin wound model.**" Arch Biochem Biophys **479**(1): p. 20-7.
- Sarugaser, R., Hanoun, L., Keating, A., Stanford, W. L. e Davies, J. E. (2009). "**Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy.**" PLoS One **4**(8): p. e6498.
- Schultz, E. (1976). "**Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle.**" Am J Anat **147**(1): p. 49-70.
- Seale, P., Ishibashi, J., Holterman, C. e Rudnicki, M. A. (2004). "**Muscle satellite cell-specific genes identified by genetic profiling of MyoD-deficient myogenic cell.**" Dev Biol **275**(2): p. 287-300.
- Seale, P. e Rudnicki, M. A. (2000). "**A new look at the origin, function, and 'stem-cell' status of muscle satellite cells.**" Dev Biol **218**(2): p. 115-24.
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. e Rudnicki, M. A. (2000). "**Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells.**" Cell **102**(6): p. 777-86.
- Selistre-de-Araujo, H. S., Cominetti, M. R., Terruggi, C. H., Mariano-Oliveira, A., De Freitas, M. S., Crepin, M., Figueiredo, C. C. e Morandi, V. (2005). "**Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of Bothrops alternatus, modulates alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation.**" Braz J Med Biol Res **38**(10): p. 1505-11.

- Serrano, S. M., Shannon, J. D., Wang, D., Camargo, A. C. e Fox, J. W. (2005). "A **multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics.**" Proteomics **5**(2): p. 501-10.
- Shi, X. e Garry, D. J. (2006). "**Muscle stem cells in development, regeneration, and disease.**" Genes Dev **20**(13): p. 1692-708.
- Shimaoka, M. e Springer, T. A. (2003). "**Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function.**" Nat Rev Drug Discov **2**(9): p. 703-16.
- Shimokawa, T., Kato, M., Ezaki, O. e Hashimoto, S. (1998). "**Transcriptional regulation of muscle-specific genes during myoblast differentiation.**" Biochem Biophys Res Commun **246**(1): p. 287-92.
- Silva, T. H. Á., Butera, A. P., Leal, D. H. S. e Alves, R. J. (2007). "**Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina  $\alpha v \beta 3$ .**" Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **43**(1): p. 1-17.
- Sinanan, A. C., Machell, J. R., Wynne-Hughes, G. T., Hunt, N. P. e Lewis, M. P. (2008). "**Alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrins and their role in muscle precursor cell adhesion.**" Biol Cell **100**(8): p. 465-77.
- Singhamatr, P. e Rojnuckarin, P. (2007). "**Molecular cloning of albolatin, a novel snake venom metalloprotease from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*), and expression of its disintegrin domain.**" Toxicon **50**(8): p. 1192-200.
- Smith, J. B., Theakston, R. D., Coelho, A. L., Barja-Fidalgo, C., Calvete, J. J. e Marcinkiewicz, C. (2002). "**Characterization of a monomeric disintegrin, ocellatusin, present in the venom of the Nigerian carpet viper, *Echis ocellatus*.**" FEBS Lett **512**(1-3): p. 111-5.
- Sohn, Y. D., Cho, K. S., Sun, S. A., Sung, H. J., Kwak, K. W., Hong, S. Y., Kim, D. S. e Chung, K. H. (2008). "**Suppressive effect and mechanism of saxatilin, a disintegrin from Korean snake (*Gloydius saxatilis*), in vascular smooth muscle cells.**" Toxicon **52**(3): p. 474-80.
- Souza, D. H., Iemma, M. R., Ferreira, L. L., Faria, J. P., Oliva, M. L., Zingali, R. B., Niewiarowski, S. e Selistre-de-Araujo, H. S. (2000). "**The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion.**" Arch Biochem Biophys **384**(2): p. 341-50.
- Stringa, E., Knauper, V., Murphy, G. e Gavrilovic, J. (2000). "**Collagen degradation and platelet-derived growth factor stimulate the migration of vascular smooth muscle cells.**" J Cell Sci **113** ( Pt 11): p. 2055-64.
- Stromblad, S. e Chersesh, D. A. (1996). "**Integrins, angiogenesis and vascular cell survival.**" Chem Biol **3**(11): p. 881-5.

- Susperregui, A. R., Vinals, F., Ho, P. W., Gillespie, M. T., Martin, T. J. e Ventura, F. (2008). **"BMP-2 regulation of PTHrP and osteoclastogenic factors during osteoblast differentiation of C2C12 cells."** J Cell Physiol **216**(1): p. 144-52.
- Takagi, J. (2007). **"Structural basis for ligand recognition by integrins."** Curr Opin Cell Biol **19**(5): p. 557-64.
- Tannu, N. S., Rao, V. K., Chaudhary, R. M., Giorgianni, F., Saeed, A. E., Gao, Y. e Raghov, R. (2004). **"Comparative proteomes of the proliferating C(2)C(12) myoblasts and fully differentiated myotubes reveal the complexity of the skeletal muscle differentiation program."** Mol Cell Proteomics **3**(11): p. 1065-82.
- Taylor, M. V. (2003). **"Muscle differentiation: signalling cell fusion."** Curr Biol **13**(24): p. R964-6.
- Teboul, L., Gaillard, D., Staccini, L., Inadera, H., Amri, E. Z. e Grimaldi, P. A. (1995). **"Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells."** J Biol Chem **270**(47): p. 28183-7.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. e Jones, J. M. (1998). **"Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts."** Science **282**(5391): p. 1145-7.
- Trikha, M., De Clerck, Y. A. e Markland, F. S. (1994). **"Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits beta 1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis."** Cancer Res **54**(18): p. 4993-8.
- Velleman, S. G. e McFarland, D. C. (2004). **"Beta1 integrin mediation of myogenic differentiation: implications for satellite cell differentiation."** Poult Sci **83**(2): p. 245-52.
- Wang, L. e Zhao, R. C. (2009). **"Mesenchymal stem cells targeting the GVHD."** Sci China C Life Sci **52**(7): p. 603-9.
- White, J. (2005). **"Snake venoms and coagulopathy."** Toxicon **45**(8): p. 951-67.
- Whittaker, C. A. e Hynes, R. O. (2002). **"Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere."** Mol Biol Cell **13**(10): p. 3369-87.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F. e Williams, K. L. (1996). **"Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it."** Biotechnol Genet Eng Rev **13**: p. 19-50.
- Yaffe, D. e Saxel, O. (1977). **"Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle."** Nature **270**(5639): p. 725-7.

- Yamada, K. M. (1997). "**Integrin signaling.**" Matrix Biol **16**(4): p. 137-41.
- Yang, R. S., Tang, C. H., Chuang, W. J., Huang, T. H., Peng, H. C., Huang, T. F. e Fu, W. M. (2005). "**Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin.**" Toxicon **45**(5): p. 661-9.
- Yao, C. C., Ziober, B. L., Sutherland, A. E., Mendrick, D. L. e Kramer, R. H. (1996). "**Laminins promote the locomotion of skeletal myoblasts via the alpha 7 integrin receptor.**" J Cell Sci **109** ( Pt **13**): p. 3139-50.
- Yeh, C. H., Peng, H. C. e Huang, T. F. (1998). "**Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin alphavbeta3 antagonist and inducing apoptosis.**" Blood **92**(9): p. 3268-76.
- Yiou, R., Yoo, J. J. e Atala, A. (2003). "**Restoration of functional motor units in a rat model of sphincter injury by muscle precursor cell autografts.**" Transplantation **76**(7): p. 1053-60.
- Yokoyama, T., Pruchnic, R., Lee, J. Y., Chuang, Y. C., Jumon, H., Yoshimura, N., de Groat, W. C., Huard, J. e Chancellor, M. B. (2001). "**Autologous primary muscle-derived cells transfer into the lower urinary tract.**" Tissue Eng **7**(4): p. 395-404.
- Yoshida, N., Yoshida, S., Koishi, K., Masuda, K. e Nabeshima, Y. (1998). "**Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'.**" J Cell Sci **111** ( Pt **6**): p. 769-79.
- Young, S. M., Bologna, C. M., Fara, D., Bryant, B. K., Strouse, J. J., Arterburn, J. B., Ye, R. D., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., Sklar, L. A. e Edwards, B. S. (2009). "**Duplex high-throughput flow cytometry screen identifies two novel formylpeptide receptor family probes.**" Cytometry A **75**(3): p. 253-63.
- Zammit, P. S., Partridge, T. A. e Yablonka-Reuveni, Z. (2006). "**The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold.**" J Histochem Cytochem **54**(11): p. 1177-91.
- Zhang, X., Huang, C., Tang, X., Zhuang, Y. e Hew, C. L. (2004). "**Identification of structural proteins from shrimp white spot syndrome virus (WSSV) by 2DE-MS.**" Proteins **55**(2): p. 229-35.
- Zhou, Q., Nakada, M. T., Brooks, P. C., Swenson, S. D., Ritter, M. R., Argounova, S., Arnold, C. e Markland, F. S. (2000). "**Contortrostatin, a homodimeric disintegrin, binds to integrin alphavbeta5.**" Biochem Biophys Res Commun **267**(1): p. 350-5.
- Zhou, X., Murphy, F. R., Gehdu, N., Zhang, J., Iredale, J. P. e Benyon, R. C. (2004a). "**Engagement of alphavbeta3 integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells.**" J Biol Chem **279**(23): p. 23996-4006.

- Zhou, X. D., Jin, Y., Chen, R. Q., Lu, Q. M., Wu, J. B., Wang, W. Y. e Xiong, Y. L. (2004b). **"Purification, cloning and biological characterization of a novel disintegrin from *Trimeresurus jerdonii* venom."** Toxicon **43**(1): p. 69-75.
- Zhu, W., Boachie-Adjei, O., Rawlins, B. A., Frenkel, B., Boskey, A. L., Ivashkiv, L. B. e Blobel, C. P. (2007). **"A novel regulatory role for stromal-derived factor-1 signaling in bone morphogenic protein-2 osteogenic differentiation of mesenchymal C2C12 cells."** J Biol Chem **282**(26): p. 18676-85.