



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO MOTIVO ECD DO
DOMÍNIO TIPO-DESINTEGRINA DA BOTROPASINA**

PRISCILA TOMIE LEME IKE*

**Dissertação apresentada com o requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Química, Curso de Pós-Graduação em
Química, Centro de Ciências Exatas,
Universidade Federal de São Carlos.**

Orientadora: Prof.(a) Dr.(a) Dulce Helena Ferreira de Souza

***Bolsista CNPq**

**São Carlos – SP
2011**

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

I26ea

Ike, Priscila Tomie Leme.

Estudo da atividade biológica do motivo ECD do domínio tipo-desintegrina da botropasina / Priscila Tomie Leme Ike. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
68 f.

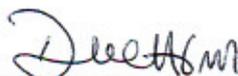
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química orgânica. 2. Bioquímica. 3. Desintegrinas. 4. Serpentes. 5. Metaloproteases. I. Título.

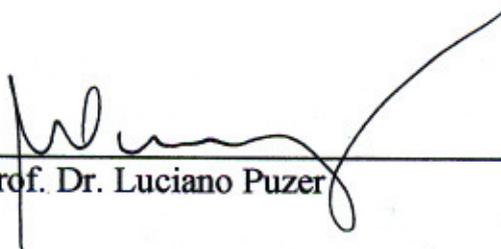
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata Priscila Tomie Leme Ike, realizada em 10 de maio de 2011:



Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza



Prof. Dr. Luciano Puzer



Profa. Dra. Fernanda Canduri

*Dedico este trabalho aos meus pais
Maria de Fátima Leme Ike
e Carlos Mitsuru Ike*

“Quando as nuvens estão cheias, a chuva cai. Uma árvore pode cair em qualquer direção, mas, no lugar que cair, ali ficará. Quem fica esperando que o vento mude e que o tempo fique bom nunca plantará, nem nada colherá”

Eclesiastes 11:3,4

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dulce Helena Ferreira de Souza pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos, pela paciência, amizade e respeito.

Às colaboradoras Dra. Heloísa S. Selistre-de-Araújo, do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, e as Dras. Solange M. T. Serrano e Marina Assakura do Laboratório Especial de Toxinologia do Instituto Butantan, pela disponibilização de seus laboratórios.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao professor Dr. Flávio Henrique da Silva do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, pelo seqüenciamento de DNA.

Ao professor Dr. Otávio Henrique Thiemann do Instituto de Física de São Carlos, pela disponibilização de seu laboratório.

À doutoranda Maria Amélia Oliva Dotta do Instituto de Física de São Carlos pelo auxílio nos experimentos de mutagênese.

À doutoranda Kelli Micocci do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar pelos experimentos de inibição da adesão celular.

À Dra. Milene Menezes do Instituto Butantan pelos experimentos de inibição da agregação plaquetária.

À Dra. Mônica Iemma, por aguentar com paciência todas as perguntas, pelos conselhos, amizade e bom humor.

Às minhas grandes parceiras no laboratório Camilla Golfeto e Ariele Moreira, por toda ajuda, amizade e... gargalhadas!!

À aluna de iniciação científica Kátia Celina Correa, pela mãozona que me deu na reta final.

A todos que conviveram comigo no LBBM nesses dois anos: Adriana, Bia, Pri Marques, Aninha, Nabor, Bianca, Paulo, Carol e Júlio.

A todos os colegas de graduação por tudo o que passamos juntos, especialmente ao Bio, Lilica, Bidu e Tássia, pela amizade, conversas e intermináveis trocas de lamúrias que começaram na iniciação e só pioraram mestrado (rsrsrs).

Às minhas amigas do coração Mari, Cris, Lidy, Jujuba, Jê, Ju e Laine, que longe ou perto, sempre conseguem me alegrar.

Ao meu 'namorado' Alexandro Zimer, por estar ao meu lado em todos os momentos. Te Amo.

Aos meus pais, Maria de Fátima e Carlos Mitsuru, pelo cuidado e amor que me deram, e por todo o sacrifício que fizeram para que eu pudesse ter uma boa educação. Amo vocês.

À todos que de alguma maneira contribuíram com este trabalho.

E agradeço a Deus pela vida e pelo amparo nas horas mais difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Integrinas	3
1.2. Metaloproteases de Venenos de Serpentes (SVMPs- <i>Snake venom metalloproteinases</i>)	10
1.3. Desintegrinas	14
1.4. Botropasina: uma SVMP de veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	19
2. OBJETIVOS	24
3. METODOLOGIA	25
3.1. Mutação sítio-dirigida	25
3.2. Obtenção das proteínas BDC e BDC-ACD	28
3.2.1. Expressão das proteínas recombinantes	28
3.2.2. Purificação das proteínas recombinantes	29
3.3. Caracterização das proteínas expressas	31
3.4. Ensaio de inibição de adesão celular	33
3.5. Ensaio de inibição de agregação plaquetária	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Mutação sítio-dirigida para obtenção da proteína mutante BDC -ACD	36
4.2. Obtenção das proteínas recombinantes	39
4.2.1. Expressão de BDC e BDC-ACD em células de <i>E. coli</i> das linhagens DH5 α e BL21(DE3)	39
4.2.2. Purificação e caracterização das proteínas clivadas	43
4.2.3. Purificação das proteínas em fusão com GST	48
4.3. Ensaio de inibição da adesão celular	49
4.4. Ensaio de inibição da agregação plaquetária	51
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Representação esquemática dos domínios das subunidades α e β da integrina.....	4
FIGURA 1.2 - Mudança conformacional na ativação das integrinas.....	6
FIGURA 1.3 - A família das integrinas.	7
FIGURA 1.4 - Classificação de SVMPs de acordo com suas estruturas.	13
FIGURA 1.5 - Alinhamento de algumas SVMPs pertencentes à classe PIII	18
FIGURA 1.6 - Estrutura tridimensional da botropasina.	20
FIGURA 1.7 - Estrutura tridimensional do domínio tipo-desintegrina da bothropasina.	21
FIGURA 4.1 - Análise em gel de agarose 1% dos clones positivos obtidos após mutação sítio-dirigida e transformação do plasmídeo em células <i>E.</i> <i>coli</i> XL1-Blue.	37
FIGURA 4.2 - Alinhamento das sequências correspondentes aos genes codificantes da proteína BDC e da proteína mutante BDC-ACD.....	38
FIGURA 4.3 - Análise em SDS-PAGE 15% dos processos de expressão das proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD nas linhagens DH5 α e BL21(DE3) de <i>E. Coli.</i>	40
FIGURA 4.4 - Análise em SDS-PAGE 15% da solubilidade das proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD expressas em <i>E. coli</i> BL21(DE3) a 37°C por 4 horas.....	41
FIGURA 4.5 - Análise em SDS-PAGE 15% da solubilidade das proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD expressas em <i>E. coli</i> BL21(DE3) a 20°C por 16 horas.....	42

FIGURA 4.6 - Análise em SDS-PAGE 15% das frações recolhidas após clivagem das proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD immobilizadas na resina.....	44
FIGURA 4.7 - Caracterização por <i>western blotting</i> da proteína BDC obtida após a clivagem na resina.	46
FIGURA 4.8 - Caracterização <i>western blotting</i> da proteína BDC-ACD obtida após a clivagem na resina.	46
FIGURA 4.9 - Análise em SDS-PAGE 15% das frações clivadas reaplicadas na resina.....	47
FIGURA 4.10 - Análise em SDS-PAGE 15% das frações eluídas da coluna de afinidade com glutatona reduzida das amostras de GST-BDC e GST-BDC-ACD.	48
FIGURA 4.11 – Diagrama esquemático da via intrínseca para o início da coagulação sanguínea	55
FIGURA 4.12 – Gráfico da inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno pelas proteínas BDC e BDC-ACD.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Programa do termociclador na reação de PCR referente à mutação do pGEX-4T-1-DC. 26

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADAM:** *A disintegrin and metalloprotease* (uma desintegrina e metaloprotease).
- ADP:** adenosina difosfato
- BSA:** albumina de soro bovino
- CAM:** molécula de adesão celular
- DNA:** ácido desoxirribonucléico
- Da:** dalton (s), unidade de massa molecular
- DMEM:** meio modificado de Dulbecco
- dNTP:** desoxinucleotídeos trifosfatados
- D.O.:** densidade óptica
- ECM:** matriz extracelular
- E. coli:*** *Escherichia coli*
- EDTA:** ácido etilenodiamino tetracético
- EGF:** fator de crescimento epidermal
- FBS:** soro fetal de bovino
- GST:** glutationa S-transferase
- HCR:** região altamente conservada
- HF3:** fator hemorrágico 3
- HVR:** região hiper variável
- IPTG:** isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
- LB:** Luria Bertani (meio de cultura de bactérias)
- mRNA:** ácido ribonucléico mensageiro
- PBS:** salina tamponada com fosfato
- PCR:** reação da polimerase em cadeia
- PFA:** paraformaldeído
- PMSF:** fenilmetilsulfonilfluoreto
- PPP:** plasma pobre em plaquetas
- PRP:** plasma rico em plaquetas
- rpm:** rotação por minuto
- SDS:** dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
- SVMP:** metaloprotease de veneno de serpente
- Tris:** tris(hidroximetil)aminometano

RESUMO

ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO MOTIVO ECD DO
DOMÍNIO TIPO-DESINTEGRINA DA BOTROPASINA

As integrinas são receptores de superfície celular capazes de mediar a adesão celular e a agregação plaquetária, que embora façam parte de importantes processos fisiológicos no organismo também estão relacionados a patologias como tumorigênese, metástase e trombose. Deste modo as integrinas constituem importantes alvos no desenvolvimento de drogas para o tratamento dessas doenças. Metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs) das classes PII e PIII por possuírem um domínio desintegrina, capazes de se ligar às integrinas inibindo sua atividade, têm sido amplamente estudadas com esse intuito. PII-SVMPs se ligam as integrinas através do motivo RGD que se encontra no domínio desintegrina. PIII-SVMPs possuem três domínios: metaloprotease (M), tipo-desintegrina (D) que apresenta o motivo ECD invés de RGD, e ‘rico em cisteína’ (C). PIII-SVMPs contendo apenas os domínios DC são capazes de interagir com integrinas inibindo adesão celular e agregação plaquetária. Contudo não se sabe qual região dessas moléculas está envolvida na ligação às integrinas, sendo que duas regiões são apontadas como prováveis responsáveis pela interação integrina-ligante: o motivo ECD e uma região denominada região hiper variável (HVR) presente em algumas PIII-SVMPs. Foi pretendido aqui colaborar para o entendimento dessa interação, avaliando a importância do motivo ECD do domínio tipo-desintegrina da Botropasina, uma PIII-SVMP. Pela estrutura tridimensional da botropasina, tem-se que no motivo ECD o resíduo aspártico (D) faz uma interação com íon cálcio, e a cisteína (C) está envolvida em uma ponte dissulfeto, porém o glutâmico (E) que é bastante reativo, encontra-se livre para interagir com outras moléculas. Assim, a proposta deste trabalho foi obter a molécula recombinante constituída pelos domínios D e C da botropasina (BDC), e também uma molécula mutante (BDC-ACD), onde o glutâmico do motivo EDC do domínio tipo-desintegrina da BDC foi substituído por um resíduo de alanina. BDC-ACD, foi obtida através de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) com a utilização do *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit*, tendo como DNA molde pGEX-4T-BDC e *primers* contendo a mutação desejada. As proteínas recombinantes foram expressas na forma solúvel em fusão com a proteína glutathione S-transferase. A purificação das proteínas recombinantes foi feita em resina *Glutathione Sepharose* e as proteínas de fusão, imobilizadas na resina, foram clivadas com a enzima trombina. BDC e BDC-ACD foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibição da agregação plaquetária onde foi verificado que a mutação realizada não alterou significativamente a atividade das proteínas, indicando que o glutâmico do

motivo ECD não está envolvido na ligação com a integrina. Também foram realizados ensaios de inibição da adesão de células de adenocarcinoma da mama (MDA-MB-231) ao colágeno e não houve inibição da adesão celular sugerindo que, assim como outras PIII-SVMPs, a BDC possa interagir com subunidades α_2 de intergrinas, que não estavam expressas nas células testadas.

ABSTRACT

BIOLOGICAL ACTIVITY STUDY OF ECD MOTIF OF DISINTEGRIN-LIKE DOMAIN OF BOTHROPASIN

Integrins are cell surface receptors that mediate cell adhesion and platelet aggregation, although they do part of important physiological processes in the organism, are also related pathologies such as tumorigenesis, metastasis and thrombosis. Thus integrins are important targets in development of drugs for the treatment of these diseases. Snake venoms metalloproteases (SVMPs) of PII and PIII class possessing a disintegrin domain, capable of binding to integrins inhibiting its activity, have been widely studied for this purpose. PII-SVMPs bind integrins via the RGD motif found in disintegrin domain. PIII-SVMPs have three domains: metalloprotease (M), disintegrin-like (D) with the ECD motif instead of RGD and 'Cysteine-rich' domain (C). PIII-SVMPs containing only DC domains are able to interact with integrins inhibiting cell adhesion and platelet aggregation. However it is not known which region of these molecules is involved in binding to integrins, and two regions are identified as likely responsible for integrin-ligand interactions: the motif ECD and a region called the hyper variable region (HVR) present in some PIII-SVMPs. The intention here was to assist the understanding of this interaction, assessing the importance of ECD motif present in disintegrin-like domain of Bothropasin, a PIII-SVMP. For the three-dimensional structure of bothropasin, we have that in the ECD motif, aspartic residue (D) made a interaction with calcium ions, and cysteine (C) is involved in a disulfide bridge, but the glutamic acid (E) which is very reactive, is free to interact with other molecules. Thus, the proposal was to obtain a recombinant molecule consisting in the D and C domains of bothropasin (BDC) and a mutant molecule (BDC-ACD), where the glutamic residue of EDC motif present in disintegrin-like domain of BDC is replaced by a alanine residue. BDC-ACD, was obtained by PCR (Polymerase Chain Reaction) using the *QuikChange@ Site-Directed Mutagenesis Kit*, with the DNA template pGEX-4T-BDC and primers containing the desired mutation. The recombinant proteins were expressed in the soluble form in fusion with glutathione S-transferase protein. Purification of recombinants proteins was made in Glutathione Sepharose resin and the fusion proteins, immobilized on the resin were cleaved with enzyme thrombin. BDC and BDC-DCA were evaluated for their ability to inhibition of platelet aggregation which found that the mutation did not cause a significant change in protein activity, indicating that the glutamic residue of ECD motif is not involved in connection with integrins. Were also assayed for inhibition of adhesion of breast adenocarcinoma cells (MDA-MB-231) to collagen and no inhibition was observed suggesting that, like the other

PIII-SVMPs, BDC interact with α_2 subunits of integrins, which are not expressed in tested cells.

1. INTRODUÇÃO

A expressão regulada de uma vasta gama de proteínas de adesão, bem como suas interações moleculares no nível celular permitem que células de um determinado tipo possam se agregar em um tecido capaz de desempenhar, de forma cooperativa, uma função comum. Diferentes tecidos, por sua vez, podem se organizar e originar um órgão que irá desempenhar uma ou mais funções específicas. A ocorrência deste tipo de organização permitiu o surgimento de organismos multicelulares complexos, tais como as plantas e os animais superiores (LODISH *et al.*, 2007).

A adesão celular ocorre por meio de proteínas receptoras integradas da membrana plasmática, denominadas moléculas de adesão celular (CAMs – *Cellular Adhesion Molecules*). A adesão pode ser do tipo célula-célula, onde uma célula adere diretamente à outra, ou do tipo célula-matriz, onde as células aderem indiretamente, por meio da ligação dos receptores da membrana plasmática, aos componentes da matriz extracelular (MEC). Esses dois tipos de interação além de permitirem a agregação das células em tecidos distintos, também constituem um modo de comunicação entre os meios intra e extracelular (LODISH *et al.*, 2007).

A MEC refere-se aos espaços intercelulares em um tecido, sendo constituída por uma intrincada rede de macromoléculas composta por uma variedade de proteínas e polissacarídeos, tais como glicoproteínas, fibronectina, colágenos, lamininas e proteoglicanos. Essas moléculas são secretadas localmente e reunidas em uma trama organizada em estreita associação com a superfície das células que as produziu. Deste modo, a MEC não deve ser vista meramente como um provedor de força e suporte físico para os tecidos. Atualmente, está claro que a matriz exerce profunda influência no

comportamento (aderência, espalhamento e migração) e no padrão de expressão gênica das células em contato com ela. As moléculas presentes na MEC são especialmente abundantes nos tecidos conjuntivos, embora também estejam presentes nos demais tecidos (ALBERTS *et al.*, 2005; CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2001; AYAD *et al.*, 1998).

As interações célula-matriz são essenciais não só para organização dos tecidos, mas também para a migração e diferenciação celular. Consequentemente, estas interações também afetam outros processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, sobrevivência e proliferação celular, e processos patológicos como tumorigênese e metástase (ALBERTS *et al.*, 2005; CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2001; LODISH *et al.*, 2007).

Um outro processo fisiologicamente importante que também é mediado por proteínas de adesão presentes na membrana celular é a agregação plaquetária, que exerce papel essencial na manutenção da hemostasia do organismo. As plaquetas (também conhecidas como trombócitos) possuem diversas características funcionais de células completas, embora sejam anucleadas e incapazes de se reproduzir (GUYTON & HALL, 2003). A agregação plaquetária é uma propriedade que as plaquetas têm de se unirem umas as outras sem perder sua individualidade (AIRES *et al.*, 1999).

A hemostasia corresponde aos mecanismos fisiológicos responsáveis por evitar a perda sanguínea e evitar a perda da fluidez do sangue, que é mantida pelo equilíbrio de vários fatores localizados nas paredes dos vasos (células endoteliais), em elementos celulares circulantes (plaquetas) e nas proteínas plasmáticas (fatores de coagulação e anticoagulação) (AIRES *et al.*, 1999). A hemostasia implica em que o processo de formação do coágulo esteja em equilíbrio com processos de parada de formação e de dissolução do coágulo (DEVLIN *et al.*, 2007). Deste modo, a agregação plaquetária desordenada, afeta o equilíbrio hemostático dando origem a processos patológicos como trombose.

Moléculas que impeçam as interações célula-célula e célula-MEC podem, a princípio, ser utilizadas para promover a inibição de eventos patológicos associados a estas interações, como formação de trombos e tumores e ocorrência de metástase.

1.1. Integrinas

As **integrinas** constituem uma família de receptores de membranas, pertencentes ao grupo das CAMs. A origem deste nome deve-se ao fato de que estas proteínas integram o meio extracelular e intracelular (HYNES, 1987). As integrinas estão presentes em todas as células nucleadas, frequentemente em grande número, e muitos membros desta família podem ser expressos simultaneamente em uma dada célula (GAHMBERG *et al.*, 2009). Entre os metazoários, as integrinas são os principais receptores de adesão célula-matriz e, em vertebrados, também podem atuar nas adesões célula-célula. Além de mediar a adesão celular, as integrinas também fazem conexões transmembrana e ativam diversas vias de sinalização intracelular. Juntamente com seus ligantes, as integrinas exercem funções importantes em muitos processos fisiológicos tais como desenvolvimento, resposta imune, tráfego de leucócitos e hemostasia (HYNES, 2002).

As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas constituídas por uma subunidade α (120 a 180 KDa) e uma subunidade β (90 a 110 KDa) associadas não covalentemente (WOLPERT, 2000). Cada uma dessas subunidades possui três regiões distintas: uma região citosólica, uma região transmembrânica e uma região extracelular, que compreende a maior parte da proteína, conforme mostra a figura 1.1.

As subunidades α das integrinas são compostas basicamente por quatro domínios: na extremidade N-terminal da cadeia, encontra-se o domínio β -propulsor, seguido por um domínio tipo-Ig “*thigh*” e pelos domínios “*calf-1*” e “*calf-2*”, domínio transmembrânico e cauda citoplasmática. As subunidades β são compostas pelo domínio PSI (Plexina – Semaforina – Integrina), um domínio tipo β I, um domínio híbrido tipo-Ig, quatro domínios tipo-EGF (*Epidermal Growth Factor*), uma cauda- β e, novamente, domínios transmembrânico e cauda citoplasmática (figura 1.1) (XIONG *et al.*, 2002).

Algumas subunidades α das integrinas contém um domínio, com cerca de 200 aminoácidos, conhecido como domínio α I (ou domínio α A), o qual antecede o domínio β -propulsor (LUO *et al.*, 2007). Nas integrinas em que está presente, o domínio α I é o principal, se não o único sítio de ligação ao ligante (GAHMBERG *et al.*, 2009).

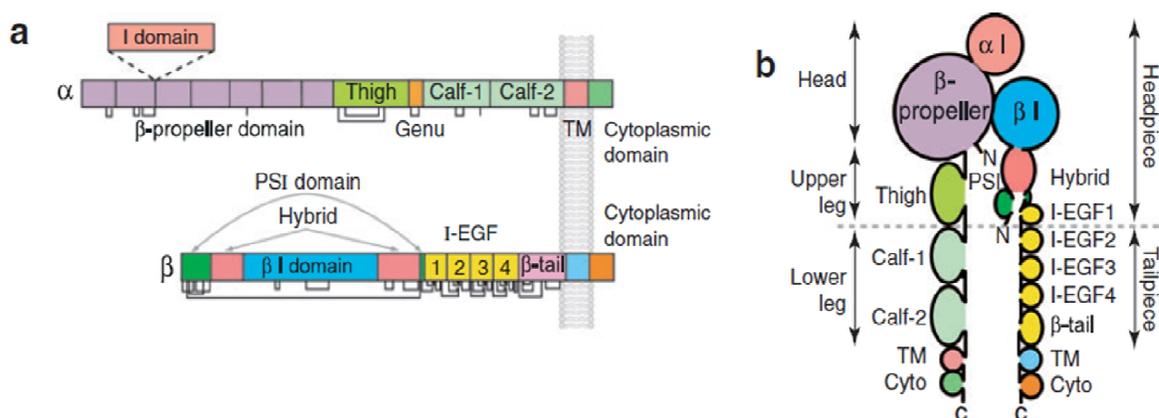


FIGURA 1.1 - Representação esquemática dos domínios das subunidades α e β da integrina. (a) Organização dos domínios dentro da estrutura primária; (b) Esquema dos polipeptídeos das subunidades α e β da extremidade N-terminal à extremidade C-terminal. TM: Região transmembrânica. Cyto: Região citoplasmática (LUO *et al.*, 2007).

Nas subunidades α em que o domínio α I é ausente, o principal sítio de ligação ao ligante é o domínio tipo β I (ou domínio β A). Este domínio está inserido na subunidade β e é análogo ao domínio α I, exceto pelo fato de que contém dois seguimentos adicionais, um que ajuda a formar uma interface com o domínio β -propulsor da subunidade α e outro que é conhecido como alça determinante da especificidade (SDL – *Specificity Determinant Loop*), devido ao seu papel na ligação ao ligante (HUANG *et al.*, 2000).

Estudos estruturais apontam alguns aspectos que influenciam a atividade das integrinas no que tange a sua interação com ligantes e participação no processo de adesão celular. As integrinas sofrem uma mudança conformacional capaz de levá-las de um estado inativo (de baixa afinidade) para um estado ativo (de alta afinidade). Esta mudança consiste na extensão das subunidades α e β , que se encontram em uma conformação articulada, onde o sítio de ligação está voltado para a membrana plasmática, o que dificulta o acesso dos ligantes. Conforme ilustrado na figura 1.2, nas subunidades α o ponto de articulação, denominado *genu*, está localizado entre os domínios “*thigh*” e “*calf-1*”; nas subunidades β , este ponto ocorre entre os domínios I-EGF 1 e PSI. Além da extensão das cadeias polipeptídicas α e β , observa-se também a ocorrência de um distanciamento entre elas na conformação ativa. A porção “cabeça” da integrina (*headpiece* – figura 1.2) também pode ocorrer em duas conformações distintas, uma fechada e outra aberta - a porção “cabeça” na conformação aberta parece proporcionar maior afinidade pelo ligante (TAKAGI *et al.*, 2002).

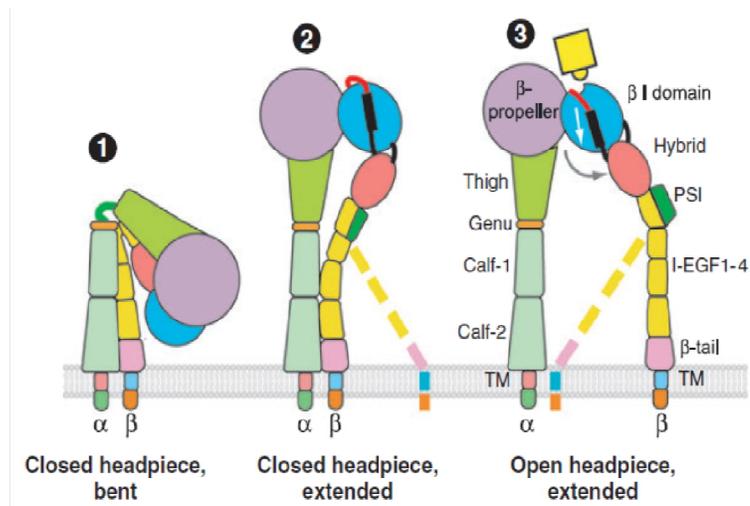


FIGURA 1.2 - Mudança conformacional na ativação das integrinas. (1) Forma articulada; (2) Forma estendida, com a porção cabeça na conformação fechada; (3) Forma estendida, com a porção cabeça na conformação aberta (LUO *et al.*, 2007).

A ligação de cátions divalentes em sítios específicos, denominados MIDAS (*Metal Ion Dependent Adhesion Site*) localizados nos domínios α I e tipo - β I também é necessária para que esses receptores possam alcançar um estado de alta afinidade por seus ligantes. No domínio tipo - β I, ocorrem mais dois domínios de ligação a íons metálicos, o ADMIDAS (*Adjacent to MIDAS*) e o LIMBS (*Ligant Induced Metal Binding Site*). O sinergismo destes sítios favorecem a ligação das integrinas a seus respectivos ligantes (LUO *et al.*, 2007; PLOW *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2007; GAHMBERG *et al.*, 2009).

Em humanos, até o presente momento, foram encontradas 18 subunidades α e 8 subunidade β distintas, que se combinam dando origem a 24 pares $\alpha\beta$ diferentes (HYNES, 2002; GAHMBERG *et al.*, 2009; COX *et al.*, 2010) (Figura 1.3). Essa diversidade faz com estas moléculas possam interagir com diversos ligantes e sejam altamente específicas. Segundo Lu e colaboradores (Lu *et al.*, 2008), as interações entre células e MEC geralmente são mediadas por integrinas β_1 . As integrinas β_2 (como $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$)

são encontradas principalmente em leucócitos e estão envolvidas nas respostas imunológicas, ligando-se frequentemente a outras moléculas de superfície celular. As integrinas $\alpha_V\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$, que compartilham a subunidade β_3 , têm sido reportadas como receptores promíscuos para proteínas adesivas contendo o motivo RGD (arginina, glicina, aspártico).

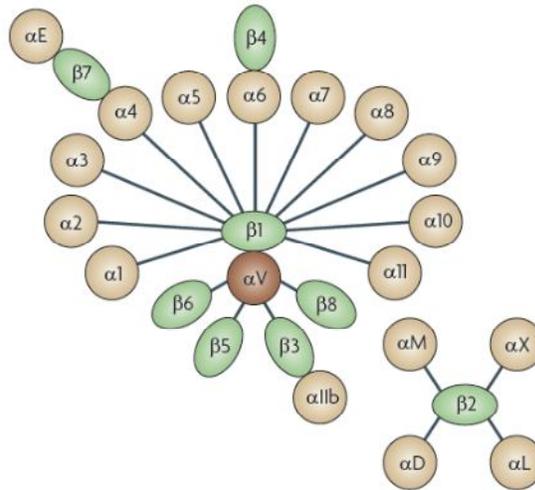


FIGURA 1.3 - A família das integrinas. A combinação das subunidades α e β levam a formação de 24 heterodímeros identificados até o momento em humanos (COX *et al.*, 2010).

A sequência RGD é a mais bem conhecida sequência de reconhecimento das integrinas nas interações integrina-ligante. Integrinas contendo as subunidades α_4 , α_5 , α_8 , α_{IIb} , α_V , se ligam a componentes da matriz que contém a sequência RGD, como fibronectina e vitronectina. Colágeno e laminina também possuem essa sequência, no entanto, nestas proteínas, o RGD costuma ser inacessível. Estes componentes da matriz extracelular são reconhecidos por integrinas contendo as subunidades α_3 , α_6 ou α_7 (receptores ligantes de laminina) ou as subunidades α_1 , α_2 , α_8 , α_{10} , α_{11} (receptores ligantes de colágeno) (FLIER & SONNENBERG, 2001).

Após a interação com ligantes extracelulares, ocorrem mudanças na mobilidade lateral das integrinas na membrana plasmática, induzindo ao agrupamentos destes receptores. Estes agrupamentos parecem ser importantes para desencadear a ativação de diferentes cascatas de sinalização citoplasmáticas – sinalização “de fora para dentro”. Embora não possuam atividade enzimática intrínseca, as integrinas são capazes de sinalizar séries de eventos. Deste modo, a transdução do sinal pela interação do ligante ocorre através do recrutamento de moléculas sinalizadoras como quinases que fosforilam proteínas e lipídios, GTPases, fosfatases e fatores de crescimento (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; SILVA *et al.*, 2007).

O estado de repouso inativo das integrinas, em que apresentam baixa afinidade por ligantes, é ativado de dentro das células por meio das regiões citoplasmática e transmembrana – sinalização “de dentro para fora”. A ativação pode ser induzida pela ligação da talina à região citoplasmática da subunidade β , resultando na separação dos domínios citoplasmáticos e na extensão das regiões extracelulares (SILVA *et al.*, 2007).

Embora sejam necessárias em processos fisiológicos importantes, como os citados anteriormente, as integrinas também estão relacionadas a algumas patologias. A primeira doença associada à esses receptores foi a trombose, que decorre da agregação de plaquetas mediada principalmente por integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ (NI & FREEDMAN, 2003; FURIE, 2009). Integrinas contendo as subunidades β_1 e β_2 , que estão envolvidas nos processos de migração e interação de células do sistema imune, têm sido associadas a doenças como esclerose múltipla e psoríase (COX *et al.*, 2010). Nos processos carcinogênicos também observa-se a participação de integrinas como a $\alpha_V\beta_3$ que está relacionada à sobrevivência, migração e angiogênese de células tumorais (LU *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2007); e $\alpha_2\beta_1$ promovem proliferação de alguns tipos de células (especialmente pancreáticas) através da adesão ao colágeno (GRZESIAK

& BOUVET, 2007). Nas infecções, verifica-se que a internalização de vários agentes infecciosos nas células ocorre por meio de interações destes agentes com integrinas. O polimorfismo do receptor $\alpha_1\beta_1$ em osteoclastos, células responsáveis pela degradação óssea, está relacionado à osteoporose, que acontece em decorrência do desequilíbrio entre a formação e degradação óssea (COX *et al.*, 2010).

Os exemplos citados acima, deixam claro que as integrinas constituem alvos em potencial para o desenvolvimento de fármacos a serem empregados no combate à essas doenças. Uma classe de proteínas denominadas **desintegrinas**, presentes em venenos de serpentes, por serem capazes de interagir com integrinas inibindo sua atividade, têm sido amplamente estudadas com o propósito de desenvolvimento de novos fármacos. As desintegrinas apresentam em sua estrutura o motivo RDG, reconhecido pelas integrinas, essa característica dá a essas proteínas um grande potencial farmacológico, de tal maneira que já existem medicamentos disponíveis no mercado ou em fase de testes clínicos desenvolvidos com base na estrutura dessas moléculas. O medicamento Tirobifan (Aggrastat), constituído por uma pequena molécula não peptídica, utilizada no tratamento de trombose através da inibição de $\alpha_{IIb}\beta_3$, foi desenvolvido com base na echistatina - desintegrina encontrada no veneno de *Echis carinatus* (COX *et al.*, 2010; NICOLAU *et al.*, 2007). Outro exemplo da aplicação do estudo com desintegrinas é o inibidor das integrinas $\alpha_V\beta_3$ e $\alpha_V\beta_5$, EMD121974, que consiste em um pentapeptídeo cíclico contendo o motivo RGD e que está sendo estudado como medicamento no combate ao câncer e à angiogênese (EKENS *et al.*, 2003).

1.2. Metaloproteases de Venenos de Serpentes (SVMPs-*Snake venom metalloproteinases*)

O medo de serpentes é uma emoção provavelmente inata do ser humano. Acidentes envolvendo mordida por serpentes são comuns e frequentemente devastadores, especialmente nas zonas rurais de países tropicais em desenvolvimento. Anualmente, calcula-se que ocorram mais de 2,5 milhões destes acidentes, dos quais aproximadamente 100.000 são fatais. Em todo o mundo, existem em torno de 3000 espécies de serpentes e cerca de 600 são peçonhentas (SAJEVIC *et al.*, 2011; WARREL, 2010).

Venenos de serpentes são ricos em proteínas, peptídeos e toxinas que têm especificidade para uma ampla gama de receptores do tecido, o que os torna cientificamente fascinantes, especialmente no que diz respeito ao seu potencial no auxílio ao desenvolvimento de drogas (WARREL, 2010).

Serpentes da família *Viperidae* induzem o envenenamento caracterizado por hemorragia, formação de bolhas, necrose e edema locais, e efeitos sistêmicos como coagulopatia, nefrotoxicidade, alterações hemodinâmicas e, em alguns casos, neurotoxicidade e cardiotoxicidade. A hemorragia induzida pelo veneno pode ocorrer localmente, no local da injeção do veneno, contribuindo para isquemia local e pobre regeneração do tecido, e também sistematicamente, afetando múltiplos órgãos e dando origem a várias complicações como choque cardiovascular, sangramento e hemorragia no sistema nervoso central (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005).

Dentre os componentes do veneno reponsáveis por esses efeitos destacam-se as metaloproteases hemorrágicas denominadas SVMPs (*Snake Venom Metalloproteinases*). Metaloproteases são proteínas cuja atividade proteolítica depende da ligação de um íon metálico em seu sítio ativo. As

SVMPs pertencem às reprotolisinas, uma subfamília das metzincinas, que constituem uma família de metaloproteases dependentes de Zn^{2+} . As metzincinas se caracterizam pela presença de uma sequência consenso, aonde ocorre a ligação do íon zinco (HEXXHXXGXXH), onde X é um aminoácido variável (GOMIS-RÜTH *et al.*, 1998). A quelatação do íon Zn^{2+} com EDTA inibe o efeito hemorrágico das SVMPs, demonstrando que atividade proteolítica destas enzimas é dependente deste íon (BJARNASON & FOX, 1994). As SVMPs degradam componentes da membrana basal e também são capazes de hidrolizar proteínas da membrana celular endotelial como integrinas e caderinas, envolvidas nas adesões célula-matriz e célula-célula (GUITIÉRREZ, 2005).

A síntese das SVMPs ocorre no citoplasma de células secretórias da glândula veninífera. As SVMPs são transferidas para o retículo endoplasmático rugoso, em seguida vão para o complexo de Golgi e finalmente são transportadas através de grânulos de secreção para o lúmen da glândula. Essas proteínas possuem uma sequência sinal, contendo 18 aminoácidos, que age como um marcador de secreção, encaminhando as proteínas nascentes à partículas de reconhecimento no retículo endoplasmático. Durante o transporte até o retículo endoplasmático, a sequência sinal é removida (FOX & SERRANO, 2008).

Além do peptídeo sinal, as SVMPs possuem um pró-domínio que atua no controle de sua atividade proteolítica, sendo portanto, sintetizadas na forma de zimogênios. Este pró-domínio é composto por cerca de 200 aminoácidos altamente conservados nos membros das SVMPs (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; FOX & SERRANO, 2008), sua remoção ocorre com a inoculação do veneno.

A atual organização das SVMPs, proposta por FOX & SERRANO (2008) divide estas proteínas em três classes, com base nos domínios que as

constituem (figura 1.4). As proteínas da classe PI são pequenas (20-30 kDa) e compreendem o peptídeo sinal, o pró-domínio e o domínio protease (comumente referido como metaloprotease ou domínio catalítico). Na classe PII estão presentes proteínas de tamanho médio (30-60 kDa), onde verifica-se a ocorrência de um domínio adicional, subsequente ao domínio protease - o domínio desintegrina. Estes dois domínios são separados por uma região espaçadora, que consiste em um seguimento interdomínio com 13 a 15 resíduos. Finalmente, as proteínas da classe PIII (60-100 kDa) se diferenciam das da classe PII por possuírem, no lugar do domínio desintegrina, um domínio denominado tipo-desintegrina; além disso, estas proteínas exibem um domínio adicional, chamado “rico em cisteína”, que é subsequente ao C-terminal do domínio tipo-desintegrina. As classes PII e PIII apresentam ainda subclasses que refletem o potencial para ocorrência de processamento proteolítico e formação de estruturas diméricas dessas proteínas (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; FOX & SERRANO, 2005).

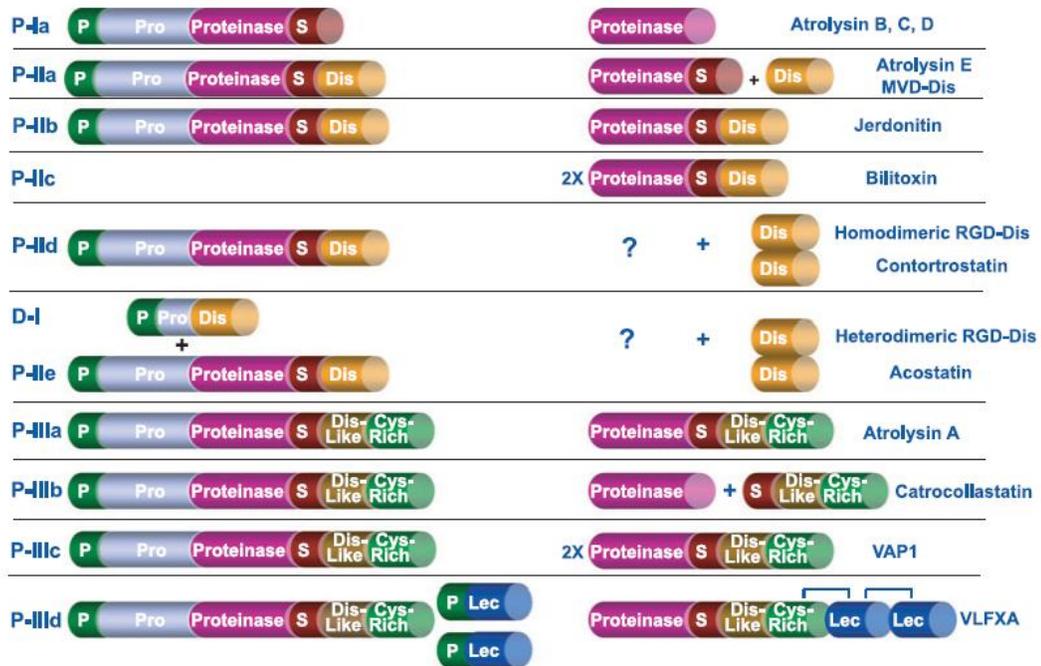


FIGURA 1.4 - Classificação de SVMPs de acordo com suas estruturas. À esquerda estão representadas estruturas dos zimogênios. À direita, estruturas após o processamento proteolítico. No canto direito são citados exemplos de proteínas correspondentes à classe representada (FOX & SERRANO, 2008).

A atual subclasse PIII-d (figura 1.4), já foi designada como classe PIV devido a presença de um domínio tipo-lectina, adicional à porção C-terminal do domínio rico em cisteína. O critério para a classificação das SVMPs era, essencialmente, a presença ou ausência de domínios não-protease observados em transcritos de mRNA e em proteínas isoladas do veneno. Contudo, nenhum transcrito da classe PIV foi observado, de tal maneira que as estruturas presentes nessa classe foram consideradas como resultados de modificações pós-traducionais de estruturas da classe PIII. Por esta razão a classe PIV foi inserida dentro da classe PIII, como uma subclasse (FOX & SERRANO, 2008).

Nem todas as SVMPs são hemorrágicas. De maneira geral, as PIII-SVMPs são toxinas hemorrágicas mais potentes que SVMPs de outros grupos como o das PI-SVMPs (BJARNASON & FOX, 1994). No processo hemorrágico, ocorre a degeneração dos tecidos formadores dos vasos capilares, causando sangramento, e a resposta hemostática é dificultada. Os mecanismos pelos quais as SVMPs induzem a hemorragia incluem a degradação de componentes importantes na manutenção da hemostasia, através da ação proteolítica do domínio catalítico. Dentre estes componentes incluem-se as proteínas da matriz extracelular, do plasma sanguíneo (como fator de von Willebrand e fibrinogênio) e das próprias integrinas. A tendência de as PIII-SVMPs serem mais hemorrágicas do que as PI-SVMPs pode ser atribuída aos domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína, que atuam ajudando a posicionar o domínio catalítico no ataque as proteínas-alvo e inibindo a agregação plaquetária induzida por colágeno impedindo a formação do tampão plaquetário, que é a primeira etapa da via de coagulação. Além disso, estudos mostram que as PIII-SVMPs são menos susceptíveis à ação de inibidores de protease presentes no plasma destacando que provavelmente os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína atuam dificultando o acesso dos inibidores aos sítios de ligação (KAMIGUTI *et al.*, 1996; GUITIÉRREZ *et al.*, 2005) .

1.3. Desintegrinas

O termo desintegrina foi inicialmente usado em 1989 para descrever uma família de proteínas provenientes de venenos de serpentes, ricas em cisteína, contendo o motivo RGD, capazes de inibir a agregação plaquetária e a adesão celular mediada por integrinas (GOULD *et al.*, 1990; NIEWIAROWSKI *et al.*, 1994; MCLANE *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2008). As moléculas de desintegrina, por interagirem especificamente com determinadas

classes de integrinas, apresentam um grande potencial para desenvolvimento de fármacos para doenças importantes e severas como tromboembolia e câncer.

Estas proteínas são originadas do processamento proteolítico de PII-SVMPs, que são então divididas em domínio metaloprotease (M) e domínio desintegrina (não enzimático) (SAJEVIC *et al.*, 2011). As PII-SVMPs, possuem o que comumente se chama domínio desintegrina “verdadeiro”, que é caracterizado pela presença do motivo RGD, reconhecido por muitas integrinas. A primeira desintegrina (trigramina) foi descoberta e purificada do veneno de *Trimeresurus gramineus* por HUANG e colaboradores em 1987 como um forte inibidor da agregação plaquetária (HUANG *et al.*, 1987). Na inibição da agregação plaquetária pelas desintegrinas o motivo RGD permite que estas proteínas ajam como antagonistas da ligação do fibrinogênio, um componente da MEC, às integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ das plaquetas.

Proteínas representantes das PIII-SVMPs, tais como botropasina (ASSUKURA *et al.*, 2003), jararagina (PAINE *et al.*, 1992) e HF3 (*Haemorrhagic Factor 3* - SILVA *et al.*, 2004), presentes no veneno de *Bothrops jararaca*; alternagina (SOUZA *et al.*, 2000), encontrada no veneno de *Bothrops alternatus*; e catrocolastina (ZHOU *et al.*, 1995), encontrada no veneno de *Crotalus atrox*, também sofrem processamento proteolítico, que separa os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína (DC) do domínio metaloprotease (M).

O domínio tipo-desintegrina se caracteriza principalmente pela presença da sequência E(D)CD no lugar do motivo RGD. Os domínios D (tipo-desintegrina) e C (rico em cisteína) não são encontrados separados no veneno, o que pode ser atribuído a existência de uma ponte dissulfeto conectando os dois domínios (TAKAEDA *et al.*, 2006; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2010).

As proteínas citadas acima, compostas somente pelos domínios DC são designadas, por exemplo, como botropasina-C, jararagina-C, alternagina-C, catrocolastina-C e DC-HF3. Os domínios DC separados do domínio metaloprotease também apresentam atividade biológica e são capazes de interferir na hemostasia do sistema. Jararagina-C e bothropasina-C e DC-HF3 apresentaram atividade de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno através de interação com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (USAMI *et al.*, 1994; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1999; KAMIGUTI *et al.*, 1996; ASSAKURA *et al.*, 2003, SILVA *et al.*, 2004). Alternagina-C inibe a adesão celular de células K562, transfectadas com integrina $\alpha_2\beta_1$, ao colégeno (SOUZA *et al.*, 2000).

Deste modo, já está estabelecido que os domínios D e C das PIII-SVMPs exercem influência sobre o funcionamento das integrinas e, conseqüentemente, sobre o sistema hemostático. No entanto, ainda não está claro qual é a contribuição exata de cada domínio nas propriedades biológicas apresentadas pelas PIII-SVMPs.

Alguns estudos, apontam a importância do motivo ECD do domínio tipo-desintegrina (análogo ao RGD das desintegrinas) na atividade das PIII-SVMPs. KAMIGUTI *et al.* (1997) demonstraram que peptídeos sintéticos, contendo o motivo ECD foram capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno, e que a substituição dos resíduos Glu ou Asp por Ala causava perda dessa atividade inibitória. A atividade quimiotática de neutrófilos humanos, induzida pela alternagina-C, foi significativamente diminuída pela presença de peptídeos sintéticos contendo o motivo ECD (MARINO-OLIVEIRA *et al.*, 2003). Por outro lado, outros estudos têm mostrado que o domínio C das PIII-SVMPs também está envolvido nos processos que são afetados por essas toxinas. Foi verificado que somente o domínio C da atrolisina-A, hemorragina presente no veneno de *Crotalus atrox*, bem como peptídeos sintéticos baseados nas sequências de aminoácidos deste domínio e do domínio rico em cisteína da jararagina também foram eficientes na inibição da

agregação plaquetária e da adesão celular mediadas por colágeno (JIA *et al.*, 2000; KAMIGUTI *et al.*, 2003).

A primeira PIII-SVMP a ter sua estrutura tridimensional resolvida, foi a VAP1 (*Vascular apoptosis-inducing protein 1*), uma proteína homodimérica encontrada no veneno de *C. Atrox* (TAKEDA *et al.*, 2006). Nesta publicação, foi descrita uma região, denominada HVR (*Hiper Variable Region*), localizada no domínio rico em cisteína (domínio C) das proteínas da classe PIII, à qual foi considerada como principal região responsável pelo reconhecimento de ligantes. Segundo MUNIZ *et al.* (2008) o alinhamento das sequências de 41 proteínas PIII-SVMPs, disponíveis em bancos de dados, confirma a ocorrência da HVR, porém, essa característica não é aplicável a todas PIII-SVMPs, pois para algumas proteínas desta classe, esta região é altamente conservada (HCR - *Highly Conserved Region*) (figura 1.5). Por esta razão, foi proposta uma nova classificação para as PIII-SVMPs, onde estas foram divididas em PIII-HVR que contém a região HVR ou PIII-HCR que contém a região HCR. Segundo esta proposta, algumas proteínas da classe PIII poderiam interagir com ligantes e/ou integrinas através da região HVR (localizada no domínio C) e a grande variabilidade da região HVR estaria associada à especificidade de interação com as diferentes integrinas. Por outro lado, é possível notar que as PIII-HCR são bastante conservadas em toda sua extensão, portanto, as proteínas desse grupo devem se ligar à integrinas com a mesma especificidade sendo que a região correspondente à HVR não pode ser apontada como sítio de ligação dessas proteínas.

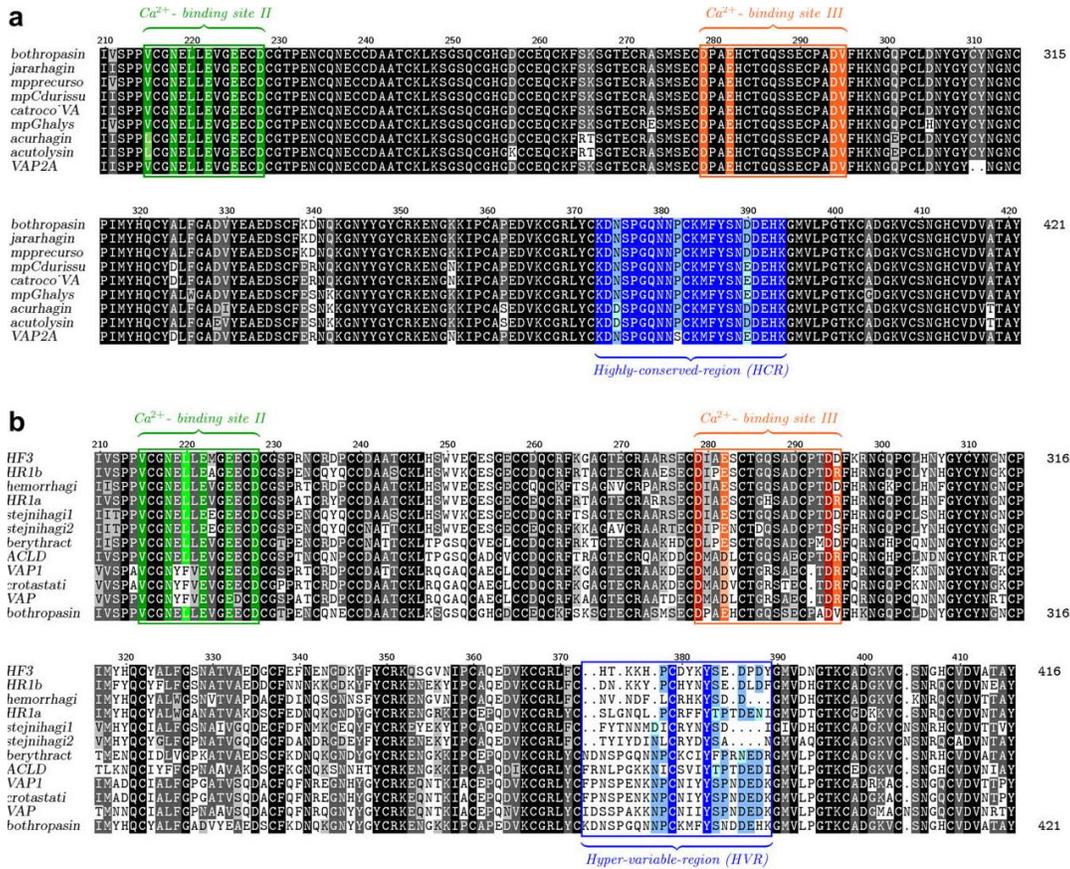


FIGURA 1.5 - Alinhamento de algumas SVMPs pertencentes à classe PIII. (a) PIII-HCR. (b) PIII-HVR. Os sítios II e III de ligação a Ca²⁺ estão destacados em verde e laranja, respectivamente. As regiões altamente conservada - HCR (em ‘a’), e hiper variável – HVR (em ‘b’) estão em azul (MUNIZ *et al.*, 2008).

De acordo com MENEZES *et al.* (2010), o domínio C de HF3, tem maior potencial de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno que o domínio D desta mesma toxina. Foi demonstrado ainda que peptídeos baseados na HVR também inibem a agregação. Por outro lado, MENEZES também mostra que a substituição de Asp por Ala no domínio ECD da DC-HF3 diminui essa atividade inibitória, além de reduzir sua habilidade em promover a migração de leucócitos, um processo mediado pela integrina $\alpha_M\beta_2$. Em um outro estudo, utilizando fragmentos recombinantes e bloqueio de partes específicas da

jararagina através de anticorpos monoclonais, TANJONI *et al.* (2010) sugere que diferentes regiões desta toxina estão envolvidas na ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$ e ao colágeno, sendo que fragmentos contendo a região hipervariável do domínio C (HVR) são capazes de se ligar a integrina.

Todos esses estudos, discutidos anteriormente, têm contribuído para um melhor entendimento de como os domínios tipo-desintegrina (D) e rico em cisteína (C) das PIII-SVMPS estão envolvidos nas interações dessas moléculas com integrinas e ligantes. No entanto, ainda não se tem conhecimento de todas as regiões das PIII-SVMPS realmente envolvidas na inibição da atividade das integrinas nos processos de adesão celular e de agregação plaquetária.

1.4. Botropasina: uma SVMPS de veneno de *Bothrops jararaca*

A botropasina, uma metaloprotease hemorrágica pertencente à classe PIII-SVMPS, foi isolada do veneno de *Bothrops jararaca* pela primeira vez em 1982, por MANDELBAUM e colaboradores (MANDELBAUM *et al.*, 1982). Esta proteína é composta por 421 aminoácidos e possui 48 kDa. Os primeiros estudos com a botropasina apontaram atividade caseinolítica na presença de Ca^{2+} e atividade hemorrágica, seguida por mionecrose e necrose arterial (QUEIROZ *et al.*, 1984).

A estrutura tridimensional da botropasina, foi resolvida por MUNIZ *et al.* (2008) através da técnica de cristalografia. A figura 1.6 mostra a estrutura geral da botropasina, contendo os três domínios: metaloprotease (M), tipo-desintegrina (D) e rico em cisteína (C).

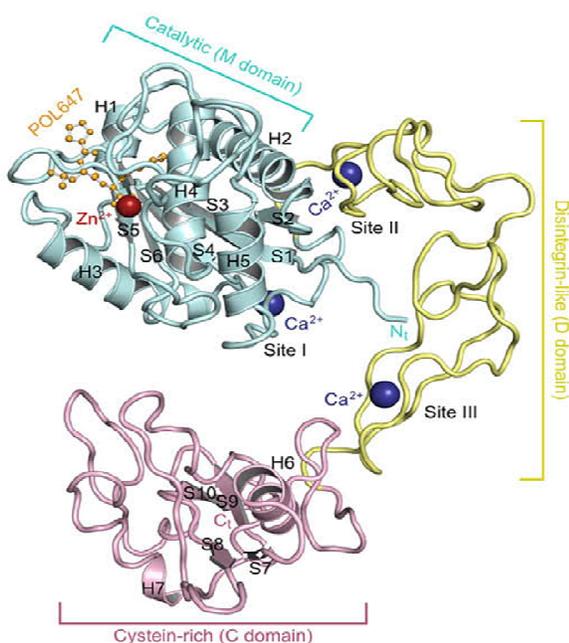


FIGURA 1.6 - Estrutura tridimensional da botropasina. Domínio metaloprotease - M (azul); domínio tipo-desintegrina - D (amarelo); domínio rico em cisteína - C (violeta) (MUNIZ *et al.*, 2008).

De acordo com a estrutura obtida o domínio metaloprotease da botropasina é caracterizado principalmente pela presença de alças e estruturas secundárias (seis folhas- β e cinco α -hélices) e pelo sítio de ligação ao Zn^{2+} característico das metzincinas. Neste domínio, encontra-se um sítio de ligação à Ca^{2+} denominado sítio I, que parece ser importante para estabilização de uma folha- β que contém a extremidade N-terminal.

Ao contrário do que ocorre no domínio M, o domínio tipo-desintegrina é carente de estruturas secundárias, sendo que ele é composto basicamente por alças ('loops') que são estabilizadas por pontes dissulfeto e por dois sítios de ligação à Ca^{2+} (sítios II e III), conforme mostra a figura 1.7. O cálcio no sítio II, localizado no início do domínio D, está coordenado por átomos de oxigênio presentes nos resíduos Val²¹⁵, Leu²²⁰, Glu²²² e Asp²²⁸. O resíduo Asp²²⁸ faz parte do primeiro motivo ECD, que é altamente conservado

nas PIII-SVMPs (figura 1.7-b) e portanto, deve ter uma função estrutural. As pontes dissulfeto encontradas no domínio D são mostradas na figura 1.7-a. Além destas, observa-se também uma ponte dissulfeto interdomínio Cys²⁷⁸-Cys³¹⁰, que conecta os domínios D e C (MUNIZ *et al.*, 2008).

O resíduo Cys²⁷⁸ faz parte do segundo motivo ECD (que é relacionado ao motivo RGD das desintegrinas). A região em que se encontra este motivo é uma alça ('loop') e é estruturalmente relacionada à região RGD das desintegrinas RGD. Na botropasina, a alça em que se encontra o motivo ECD é estabilizada pela ponte dissulfeto Cys²⁷⁸-Cys³¹⁰ e por Ca²⁺ no sítio de ligação ao cálcio III. Neste sítio, o cálcio é coordenado por cinco átomos de oxigênio, sendo que dois deles provém do resíduo Asp²⁷⁹ (pertencente ao domínio ECD) (figura 1.7-c).

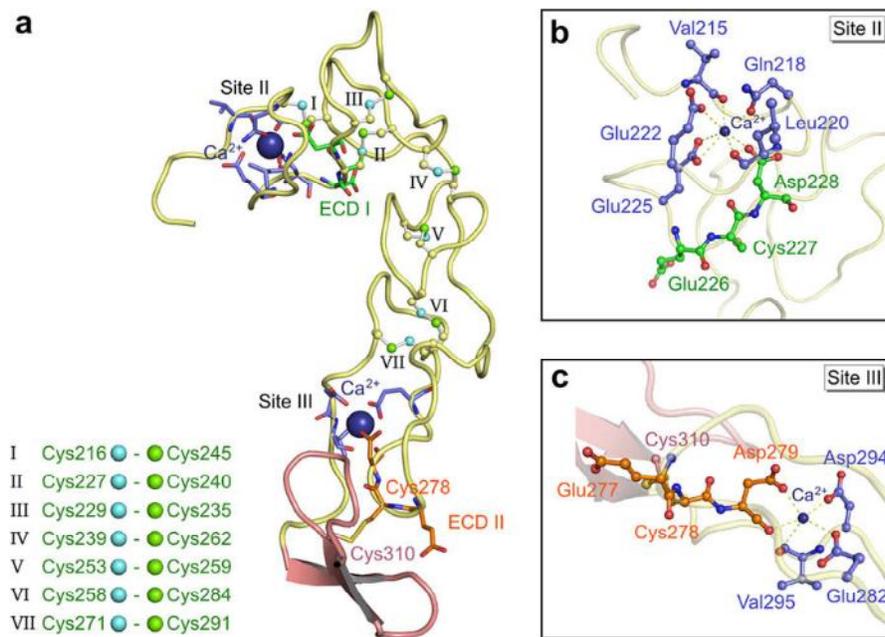


FIGURA 1.7 - Estrutura tridimensional do domínio tipo-desintegrina da bothropasina. (a) estrutura geral do domínio D e localização das pontes dissulfeto; (b) sítio de ligação ao cálcio II; (c) sítio de ligação ao cálcio III (MUNIZ *et al.*, 2008).

Portanto, no segundo motivo ECD da botropasina, correspondente ao RGD das desintegrinas, temos que a cisteína está envolvida em uma ponte dissulfeto, e o ácido aspártico faz parte de um sítio de ligação ao cálcio, que deve ser importante para a estabilização do 'loop'. No entanto, a cadeia lateral do glutâmico (E_CD) não participa de nenhuma interação intramolecular e se mostra exposta ao solvente. O arranjo deste resíduo glutâmico na molécula, aliado ao fato deste resíduo ser negativamente carregado, portanto, bastante reativo, suporta a hipótese de que o domínio ECD das proteínas tipo-desintegrinas esteja envolvido no reconhecimento de ligantes e contribua para atividade biológica destas proteínas. Além disso, a botropasina pertence a classe das PIII-SVMPs que tem a região HCR, ou seja, o domínio C desta proteína é altamente conservado, o que sugere a possibilidade de o domínio D ter, em relação ao domínio C, um envolvimento na interação da botropasina com seus ligantes.

Embora já existam importantes estudos avaliando a importância do motivo ECD por meio de peptídeos sintéticos, sabemos que este mesmo motivo, dentro do arranjo tridimensional da proteína, pode ter sua capacidade de interação modificada. Como mencionado anteriormente, recentemente, foi publicado um trabalho onde foi avaliada a importância do ECD através de mutação sítio dirigida em HF3 (MENEZES *et al.*, 2010), que também é uma PIII-SVMP, no entanto, o mutante obtido foi modificado no resíduo aspártico (D) e não no resíduo glutâmico do ECD.

Neste estudo, pretende-se colaborar com o entendimento da relação estrutura-função das PIII-SVMPs, avaliando a contribuição do motivo ECD, em especial do resíduo glutâmico (E) deste motivo, na atividade biológica da botropasina através da obtenção de uma proteína mutante, cujo referido motivo ECD foi modificado.

Dado o grande potencial das PIII-SVMPs no desenvolvimento de fármacos, decorrente da capacidade que possuem de interagir com grande especificidade com integrinas, que por sua vez estão associadas à importantes

patologias, fica clara a importância de se compreender os mecanismos pelos quais essas interações ocorrem.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista as colocações apresentadas anteriormente, o objetivo deste trabalho foi contribuir para o conhecimento dos mecanismos pelos quais as SVMPs da classe PIII interagem com as integrinas e/ou ligantes, especialmente no que se refere à contribuição do motivo ECD do domínio tipo-desintegrina da botropasina-C (BDC).

Deste modo, pretendeu-se inicialmente obter uma proteína mutante onde o ácido glutâmico (E) do motivo ECD seria substituído por um resíduo de alanina (A). Esta proteína foi chamada aqui de BDC-ACD: domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína da botropasina contendo o motivo ECD mutado para ACD. Para tanto, foi realizada uma mutação sítio-dirigida a partir do plasmídeo pGEX-4T-DC (plasmídeo pGEX-4T clonado com inserto que codifica a BDC).

Para estudos comparativos, também foi obtida a proteína recombinante não mutante (BDC), cujos protocolos de expressão e purificação já foram descritos na literatura (ASSAKURA *et al*, 2003).

As proteínas obtidas, BDC e BDC-ACD, foram avaliadas quanto ao seu potencial de inibição da agregação plaquetária e inibição da adesão celular induzida por colágeno, permitindo a verificação da influência dessa mutação na atividade biológica dessas proteínas.

3. METODOLOGIA

3.1. Mutação sítio-dirigida

A mutação do resíduo glutâmico (E) por alanina (A) no motivo ECD (resultando no motivo ACD) da botropasina C (aqui chamada de BDC, que se refere aos domínios desintegrina e rico em cisteína da botropasina) foi realizada com o *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Nesta metodologia, são usados a *PfuTurbo® DNA Polymerase* e um termociclador (para controle de temperatura). A *PfuTurbo DNA Polymerase* replica uma fita dupla de DNA com alta fidelidade e assim, usando um plasmídeo com o inserto de interesse e dois *primers* de oligonucleotídeos contendo a mutação de interesse, pode-se obter o mutante desejado (isto é, o inserto mutado e clonado no plasmídeo inicialmente utilizado). Os *primers*, complementares às fitas opostas do vetor, são estendidos pela *PfuTurbo DNA polymerase* durante ciclos de temperatura. Após os ciclos de temperatura e síntese do plasmídeo com o inserto mutado, o produto é tratado com a enzima *Dpn I*, que digere o DNA molde metilado da *E.coli* (DNA molde). Portanto, faz-se uma seleção do DNA sintetizado contendo a mutação desejada.

Neste projeto, a mutação desejada (a substituição do resíduo glutâmico (E) por um resíduo de alanina (A) no motivo ECD da proteína BDC) foi feita usando como DNA molde o plasmídeo pGEX-4T-1-BDC (plasmídeo pGEX-4T-1 clonado com o inserto que codifica a proteína botropasina-C), que foi fornecido pelas Dras. Marina T. Assakura e Solange M.T. Serrano do Instituto Butantan. Os oligonucleotídeos usados foram:

Sense: 5' – TGCCGGGCATCAATGAGTGCTTGTGACCCGGCTGAACAC - 3'

Anti-sense: 5' – GTGTTCA GCCGGGTCACAAGCACTCATTGATGCCCGGC - 3'

As bases em destaque referem-se ao ponto da mutação, onde o códon GAA que codifica a síntese do resíduo ácido glutâmico do motivo ECD foi substituído pelo códon GCT que codifica a síntese do resíduo alanina.

Na reação de PCR (*Polimerase chain reaction*) foram utilizados 0,8 ng.mL⁻¹ de DNA molde, 1,2 picomoles de cada *primer* (oligonucleotídeo), 2,5 U de enzima *PfuTurbo* DNA Polymerase, tampão de reação (Tris-HCl 200 mM, KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄, 100 mM, MgSO₄, 20 mM, Triton® X-100 1% e Soro Albumina Bovina (BSA) 1mg.mL⁻¹), 0,2mM de dNTPs (mistura equimolar de dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1mM de MgCl₂ e água para completar um volume de 50 µL. A reação de amplificação do DNA plasmidial foi realizada em um termociclador PTC-100 TM MJ *Research Thermocycler* programado conforme a Tabela 1, sendo que a segunda, terceira e quarta etapas se repetem 20 vezes em ciclo.

TABELA 3.1 - Programa do termociclador na reação de PCR referente à mutação do pGEX-4T-1-DC.

Etapa	Temperatura	Tempo
1 ^a – Início	95 °C	30 segundos
2 ^a – Desnaturação	95 °C	30 segundos
3 ^a – Anelamento	55 °C	1 minuto
4 ^a – Extensão	68 °C	12 minutos
5 ^a – Finalização	68 °C	10 minutos

O produto do PCR foi incubado com 10 U da enzima de restrição *Dpn* I, durante 1 hora, a 37 °C, para digestão do DNA parental (não mutante).

Células competentes (50 μL), previamente tratadas com solução contendo CaCl_2 , de *Escherichia coli* da linhagem XL1-Blue, foram transformadas com o produto de PCR. A transformação foi feita através de choque térmico, incubando-se as células com 5 μL do produto de PCR a 42°C por 45 segundos e, logo em seguida, colocando-as no gelo por 2 minutos.

As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultura sólido LB Agar (Luria Bertani), contendo antibiótico ampicilina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), por 16 horas, a 37°C. As colônias obtidas foram crescidas em meio LB líquido com o mesmo antibiótico, por 16 horas, a 37°C, com agitação de 200 rpm e o DNA plasmidial de cada colônia foi purificado com kit *SV Minipreps – DNA Purification System* da marca Promega. Para seleção dos clones positivos foi feita reação de clivagem com endonuclease de restrição *BamH* I (Fermentas), e posterior análise em eletroforese em gel de agarose 1%.

O DNA plasmidial das colônias foi sequenciado no laboratório do professor Flávio Henrique da Silva (Departamento de Genética e Evolução – UFSCar), em um seqüenciador ABI PRISM 377, utilizando a técnica dos dideoxinucleotídeos, de acordo com a metodologia descrita por SANGER *et al.*, (1997). Para o seqüenciamento foram utilizados os oligonucleotídeos do plasmídeo pGEX-4T-1. As seqüências de DNA obtidas foram alinhadas com a seqüência codificante da BDC com o auxílio do software ClustalW2 disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>. O clone contendo a mutação desejada (chamado de pGEX-4T-1-BDC-ACD), confirmado por seqüenciamento do DNA, foi usado para transformar outras linhagens de *E.coli* e realizar a subsequente expressão da proteína mutante (BDC-ACD).

3.2. Obtenção das proteínas BDC e BDC-ACD

Neste tópico são descritos os procedimentos realizados para a expressão das proteínas BDC (domínios DC da botropasina) e BDC-ACD (domínios DC mutado no motivo ECD da botropasina).

3.2.1. Expressão das proteínas recombinantes

Inicialmente, foi feito um teste de expressão das proteínas com células de *E. coli* das linhagens DH5 α e BL21(DE3) a fim de se verificar qual delas apresentaria o maior nível de expressão. Para tanto, culturas de ambas as células foram transformadas com o plasmídeo pGEX-4T-1-BDC, para expressão da BDC, e com o plasmídeo pGEX-4T-1-BDC-ACD para expressão da BDC-ACD. As duas proteínas foram expressas em fusão com Glutathione S-Transferase (GST), uma vez que o plasmídeo pGEX permite a fusão da proteína de interesse com a GST, e todas as etapas dos processos de expressão e purificação foram iguais para BDC e BDC-ACD.

A partir de uma colônia da placa de ágar contendo as células transformadas, foi feito um pré-inóculo em 5mL de meio LB líquido (Luria Bertani), contendo o antibiótico ampicilina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Esta cultura foi mantida à 37 °C, sob agitação de 200 rpm, durante 16 horas. Em seguida preparou-se um inóculo, diluindo-se 100 μL do pré-inóculo em 10 mL do mesmo meio contendo este mesmo antibiótico na mesma concentração. O inóculo foi mantido à 37°C, sob agitação de 200 rpm. O crescimento celular foi monitorado medindo-se a densidade óptica (DO) da cultura a 600 nm em um espectrofotômetro DU[®] 800 (Beckman Coulter). Ao atingir a DO de aproximadamente 0,6 a expressão da proteína foi induzida com a adição de

IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) (Sigma) - concentração final de 0,5mM - ao inóculo que foi mantido à 37°C, sob agitação de 200 rpm, durante 4 horas. Uma alíquota de 100 μ L da cultura foi coletada para análise da expressão por eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE; LAEMMLI, 1970).

Após a avaliação em SDS-PAGE da melhor linhagem de *E.coli* para expressão das proteínas BDC e BDC-ACD, as proteínas foram produzidas em escala maior. A metodologia utilizada foi basicamente a mesma descrita acima, contudo, foi feito um volume maior de inóculo (diluindo-se 5 mL de pré-inóculo em 500 mL de meio de cultura). Além disso, foram feitas modificações nas condições de expressão para aumentar a solubilidade das proteínas recombinantes expressas. A temperatura e o tempo de indução foram modificados para 20°C e 16 horas, respectivamente.

3.2.2. Purificação das proteínas recombinantes

Após a indução da expressão das proteínas BDC e BDC-ACD com IPTG, as células foram centrifugadas em uma centrífuga *Legend Mach 1.6 R* (Sorvall), a 4000 rpm a 4°C, por 10 minutos. O meio de cultura (sobrenadante) foi descartado e o precipitado bacteriano foi ressuspenso em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton 1%, pH 7,4). As células foram lisadas com a técnica de ultrassom em um sonificador *Sonic Dismembrator model 500* (Fischer Scientific) durante 10 minutos, sendo 10 pulsos de 59,9 segundos e intervalos de 10 segundos, com amplitude de 23%. O lisado celular obtido foi centrifugado a 9000 rpm a 4°C, por 30 minutos. A solubilidade das proteínas obtidas foi analisada por SDS-PAGE em gel de 15%.

O sobrenadante (fração solúvel), obtido após a centrifugação do lisado celular, foi purificado através de cromatografia de afinidade utilizando a resina *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (GE Healthcare). O processo de purificação com a resina foi realizado *in bath*, sendo que neste método a fração solúvel do lisado é adicionada à resina, de modo que ela se homogenize e, após a sua sedimentação recolhe-se o sobrenadante (que representa as proteínas que não têm afinidade pela resina). Em um tubo de 15 mL, foram adicionados 10 mL de fração solúvel à 350 µL de resina previamente lavada 4 vezes com 10 mL de água deionizada e equilibrada com 5 volumes de tampão PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4). A resina, embebida com o sobrenadante, foi deixada em um banho de gelo, com suave agitação, durante 1 hora. Após a decantação da resina, o sobrenadante foi recolhido (esta amostra foi chamada de *void*). Ressuspendeu-se a resina com 1 mL de tampão e a mesma foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, onde foi lavada mais 10 vezes com 1 mL de tampão PBS. Em seguida, foi iniciado o processo de clivagem, com trombina, das proteínas em fusão (GST-BDC e GST-BDC-ACD) ligadas à resina.

3.2.2.1. Clivagem das proteínas em fusão e purificação das proteínas BDC e BDC-ACD

As proteínas em fusão (GST-BDC e GST-BDC-ACD) imobilizadas na *Glutathione Sepharose* foram separadas através de clivagem com a enzima trombina (Sigma). Neste procedimento, 350 µL de resina, contendo as proteínas de fusão ligadas conforme descrito acima, foram incubados com 3 U de trombina (Sigma) em 500 µL de tampão PBS, por 2 horas, em um banho seco (HVD) à 37°C com agitação de 150 rpm. Após a incubação, aguardou-se

novamente a decantação da resina e a fração de clivagem (chamada de *sobrenadante*) foi recolhida. A proteína GST ligada à resina foi removida com a aplicação de 1mL de glutathione reduzida (Sigma) 10 mM.

As frações clivadas eluídas foram novamente adicionadas a 150 µL de *Glutathione Sepharose* (lavada e equilibrada sob as mesmas condições descritas anteriormente) e recolhidas após a decantação da resina. Este procedimento foi repetido 2 vezes.

3.2.2.2. Purificação das proteínas em fusão com GST (GST-BDC e GST-BDC-ACD)

Também foram purificadas as proteínas em fusão, GST-BDC e GST-BDC-ACD, através da eluição com solução de glutathione reduzida 10 mM, em tampão PBS. As frações eluídas foram dialisadas contra tampão PBS para retirada da glutathione reduzida (eluente).

As amostras obtidas foram analisadas por SDS-PAGE 15%, caracterizadas por *western blotting* (item 3.3) e quantificadas pelo método de BRADFORD (1976).

3.3. Caracterização das proteínas expressas

As proteínas expressas e purificadas foram caracterizadas por *western blotting*, que consiste em um método analítico, associado a técnicas de

separação por eletroforese, que permite a detecção de proteínas específicas, em uma dada amostra, através de anticorpos (RENART *et al*, 1979).

As amostras foram resolvidas por eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida e as proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Para tanto, montou-se um “sanduíche” colocando-se o gel obtido em contato com a membrana de nitrocelulose (Millipore) e de cada um dos lados, um pedaço de papel de filtro e um pedaço de esponja, todos imersos em tampão de transferência (Tris 200 mM, glicina 50 mM, metanol 15%). Este “sanduíche” foi colocado em uma cuba de transferência (Mini V8 – GIBCO BRL – Life Technologies) e submetido a uma voltagem de 150 V e 80 mA, durante 1 hora e 30 minutos. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau (0,5% Ponceau em ácido acético 0,1%) por 2 minutos e descorada com ácido acético 1% até que fosse possível visualizar as bandas. A membrana foi então incubada por 12h, a 4°C, em solução de bloqueio - TBS (Tris 50 mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,3%, pH 7,4,) acrescido de leite em pó desnatado 5%. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS e incubada por 2 horas com anticorpo primário (antibotrasina produzido em coelho) diluído na proporção 1:1000 em TBS. Em seguida, a membrana foi novamente lavada com TBS e incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho) diluído na proporção 1:1000 em TBS, por mais 2 horas. Após reação com os anticorpos, a membrana foi colocada em uma solução reveladora (SIGMA FASTTM BCIP/NBT *tablet*) por 5 minutos e depois foi descorada com água deionizada.

Foram realizados experimentos também com anticorpo primário anti-GST de camundongo (Calbiochem) e o respectivo anti-IgG de camundongo para detecção da proteína em fusão.

3.4. Ensaios de inibição de adesão celular

Nesses ensaios avaliou-se as proteínas clivadas (BDC e BDC-ACD) e em fusão (GST-BDC e GST-BDC-ACD), quanto ao potencial de inibição da adesão de células de adenocarcinoma da mama da linhagem MDA-MB-231 à proteína da MEC, colágeno tipo I.

Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços. As placas foram previamente preparadas adicionando-se colágeno tipo I, na concentração de 1 µg/poço aos poços das placas a serem utilizadas. Estas placas foram incubadas a 4 °C, *overnight*. Em seguida, fez-se o bloqueio dos poços contendo colágeno, incubando-os com solução de BSA 0,5% em PBS durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Após o bloqueio os poços foram lavados com DMEM sem FBS.

Células na quantidade de 1×10^5 foram incubadas com as proteínas a serem avaliadas (em concentrações de 1 a 10000 nM das proteínas) durante 30 minutos, a 37 °C e, em seguida, adicionadas aos poços contendo colágeno. As placas contendo as células foram incubadas por 45 minutos, a 37 °C, e os poços foram lavados com DMEM sem FBS e as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% ou etanol 70% (100 µl), por 10 minutos. Em sequência, os poços foram lavados com 100 µL de PBS e as células aderidas foram coradas com 70µl de corante Cristal Violeta 0,5% durante 30 minutos. Em seguida, os poços foram lavados com PBS diversas vezes para retirada do excesso de corante e as células coradas foram lisadas em 100 µl SDS 1% durante 30 minutos. A leitura da placa foi feita a 540 nm em leitor de absorvância Dynex. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Nos controles positivos, as células foram incubadas a 37 °C com PBS sem as proteínas de interesse. Nos controles negativos, os poços foram incubados com BSA 1 %, a 4°C, *overnight*, ao invés de serem incubados com

colágeno e, além disso, as células também foram incubadas a 37 °C com PBS sem as proteínas de interesse.

Os testes de inibição da adesão celular foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, em colaboração com a professora Dra. Heloísa S. Selistre-de-Araújo.

3.5. Ensaios de inibição de agregação plaquetária

Os ensaios de inibição da agregação plaquetária foram realizados em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi obtido a partir de 20 mL de sangue humano fresco, fornecido por um doador saudável. A amostra de sangue foi coletada em solução de citrato de sódio (concentração final 0,38%). Centrifugou-se o sangue coletado a 30°C, 190 g, por 20 minutos para obtenção do PRP. Uma alíquota de 1 mL do PRP foi centrifugada novamente a 1600 g, por 1 minuto, em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi recolhido obtendo-se assim o plasma pobre em plaquetas (PPP) que foi utilizado como branco.

Alíquotas de 450 µL de PRP foram induzidas à agregação plaquetária com o uso do antagonista colágeno tipo I (4µg.mL⁻¹). À resposta de agregação obtida após a adição do colágeno foi dado o valor de 100% de agregação. Para avaliar o potencial inibitório da agregação plaquetária de BDC e BDC-ACD, o PRP foi incubado, por 2 minutos, à 37°C, com as respectivas proteínas antes de adição de colágeno. Os ensaios foram feitos em triplicata. A leitura da extensão da agregação plaquetária foi medida em um agregômetro da marca Chrono-log. Estes experimentos foram feitos no Laboratório Especial de

Toxinologia Aplicada CAT-CEPID do Instituto Butantan, em colaboração com a Dra. Solange M. T. Serrano.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão descritos os resultados obtidos nas etapas de obtenção do DNA que codifica a proteína mutante BDC-ACD, obtenção, purificação e caracterização das proteínas de interesse (BDC e BDC-ACD) e nos testes de adesão celular e agregação plaquetária com BDC e BDC-ACD.

4.1. Mutação sítio-dirigida para obtenção da proteína mutante BDC -ACD

A escolha da alanina como aminoácido substituinte para o glutâmico foi feita em função da baixa reatividade de seu grupo lateral (CH_3) em comparação com o grupo lateral do resíduo de glutâmico ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$).

A partir da análise da sequência de nucleotídeos da BDC (domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína da botropasina-C, GenBank: AF056025.2) foram desenhados os dois oligonucleotídeos (*sense* e *reverse*) contendo a mutação desejada: do resíduo glutâmico para o resíduo alanina do motivo ECD da molécula BDC. Através de reação em cadeia da polimerase e partindo do DNA molde (o vetor pGEX-4T-1-BDC), dos oligonucleotídeos, de dNTPs e da enzima *PfuTurbo* DNA Polymerase, foi possível obter e amplificar o DNA mutado, denominado pGEX-4T-1-BDC-ACD. O plasmídeo mutado foi transformado em culturas de células XL1-Blue de *E.coli* para sua propagação. Os DNAs extraídos e purificados das colônias selecionadas (4) após a transformação foram clivados com a endonuclease de restrição *BamH* I e os DNAs foram analisados em gel de agarose 1%. Conforme mostra a Figura 4.1, é possível observar uma banda em torno de 6000 pb, correspondente ao plasmídeo

pGEX-4T-1-BDC-ACD, cujo tamanho calculado é 5667 pb. Foi feita uma comparação com o plasmídeo não linearizado (dados não mostrados) verificando-se a linearização dos plasmídeos após a clivagem com a enzima *Bam*H I, o que confirmou a clonagem.

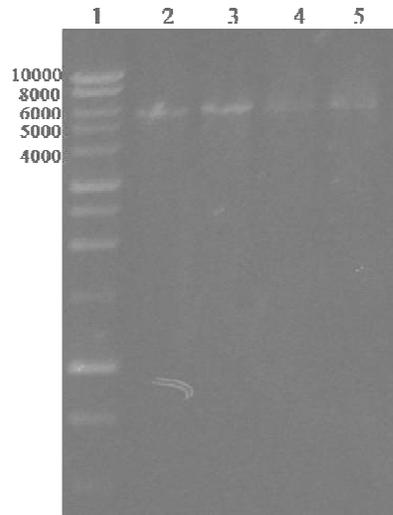


FIGURA 4.1 - Análise em gel de agarose 1% dos clones positivos obtidos após mutação sítio-dirigida e transformação do plasmídeo em células *E. coli* XL1-Blue. 1) Padrão 1kb DNA ladder da Promega; 2-5) DNAs plasmidiais extraídos de quatro colônias.

Os quatro clones selecionados foram sequenciados e um deles foi utilizado para a continuidade do trabalho. A figura 4.2 mostra o alinhamento da sequência de DNA do clone mutante escolhido com a sequência de DNA codificante da BDC depositada no GenBank. Podemos verificar que a mutação sítio-dirigida (sublinhada) foi obtida conforme o esperado, ou seja, o códon GAA, que codifica o resíduo glutâmico, foi substituído pelo códon GCT, que codifica o resíduo alanina.

```

BDC-ACD      GCTGGCGACCATCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCCCGTGGATTCCCGGAATCCGGTTCGGG 60
BDC          -----TTGAG 5
                *** *

BDC-ACD      AACAGATAATGGTTCACCTCCAGTTCGGTGGAAATGAACTTCGGAGGTGGGAGAAGAATG 120
BDC          AACAGATAATGGTTCACCTCCAGTTCGGTGGAAATGAACTTCGGAGGTGGGAGAAGAATG 65
                *****

BDC-ACD      TGACTGTGGCACTCCTGAAAAATGTCAAAAATGAGTGTCTGCGATGCTGCAACGTGTAAACT 180
BDC          TGACTGTGGCACTCCTGAAAAATGTCAAAAATGAGTGTCTGCGATGCTGCAACGTGTAAACT 125
                *****

BDC-ACD      GAAATCAGGGTACACAGTGTGGACATGGAGACTGTTCGTGAGCAATGCAAAATTCAGCAAAATC 240
BDC          GAAATCAGGGTACACAGTGTGGACATGGAGACTGTTCGTGAGCAATGCAAAATTCAGCAAAATC 185
                *****

BDC-ACD      AGGAACAGAATGCCGGGCATCAATGAGTGCCTTCGTGACCCGGCTGAACACTGCACCTGGCCA 300
BDC          AGGAACAGAATGCCGGGCATCAATGAGTGAATGTGACCCGGCTGAACACTGCACCTGGCCA 245
                *****

BDC-ACD      ATCCCTGAGTGTCTGCAGATGCTTCATTAAGAAATGGACAACCATGCCTGAGATAACTA 360
BDC          ATCCCTGAGTGTCTGCAGATGCTTCATTAAGAAATGGACAACCATGCCTGAGATAACTA 305
                *****

BDC-ACD      CGGTACTGCTACAAATGGGAATGCCCCATCATGTATCACCAATGTATGCTCTCTTCGG 420
BDC          CGGTACTGCTACAAATGGGAATGCCCCATCATGTATCACCAATGTATGCTCTCTTCGG 365
                *****

BDC-ACD      TGCAGATGTTATGAGGCTGAAGATTCATGCTTCAAAGATAACCAGAAAGGCAATTAATTA 480
BDC          TGCAGATGTTATGAGGCTGAAGATTCATGCTTCAAAGATAACCAGAAAGGCAATTAATTA 425
                *****

BDC-ACD      TGGCTACTGCAGAAAGGAAAAATGGTAAAAAGATTCATGTGCACCAGAAGATGTAAAAATG 540
BDC          TGGCTACTGCAGAAAGGAAAAATGGTAAAAAGATTCATGTGCACCAGAAGATGTAAAAATG 485
                *****

BDC-ACD      TGGCAGGTATATCTGCAAAGATAAATTCACCTGGACAAAATAATCCCTGCAAGATGTCTTA 600
BDC          TGGCAGGTATATCTGCAAAGATAAATTCACCTGGACAAAATAATCCCTGCAAGATGTCTTA 545
                *****

BDC-ACD      TTCCAACGATGATGAACATAAGGGAAATGGTTCCTTCCTGGAACAAAATGTGCAGATGGAAA 658
BDC          TTCCAACGATGATGAACATAAGGGAAATGGTTCCTTCCTGGAACAAAATGTGCAGATGGAAA 605
                *****

BDC-ACD      GGTGTGCAGCAACGGGCATTCGTGTGATGTGGCTACAGCCTACTAGGCGGCCGCTCGT 716
BDC          GGTGTGCAGCAACGGGCATTCGTGTGATGTGGCTACAGCCTACT----- 648
                *****
    
```

FIGURA 4.2 - Alinhamento das sequências correspondentes aos genes codificantes da proteína BDC e da proteína mutante BDC-ACD. As bases idênticas estão marcadas com *. O sítio de mutação está sublinhado.

Logo no início do alinhamento, pode-se verificar que a quarta base de BDC, não tem identidade com a quarta base de BDC-ACD. Essa troca alterou

o segundo resíduo da proteína BDC-ACD, que passou a ser uma arginina, ao invés de uma glicina. Contudo, com base na análise da estrutura dos domínios DC da botropasina através do programa *PyMol* (<http://www.pymol.org/>) considerou-se que esta alteração não iria afetar significativamente a estrutura da proteína, nem a sua atividade. Além disso, a esta região (início do domínio DC) nunca foi atribuída a probabilidade de estar envolvida em interações com ligantes e ainda, pela análise das sequências de outras PIII-SVMPs observa-se que os resíduos nesta posição são variáveis (glicina para botropasina e catrocolastina; lisina para HR1B; glutamina para atrolisina; e arginina para HF3).

4.2. Obtenção das proteínas recombinantes

4.2.1. Expressão de BDC e BDC-ACD em células de *E. coli* das linhagens DH5 α e BL21(DE3)

Após a confirmação da mutação desejada, o plasmídeo pGEX-4T-1-BDC-ACD foi transformado em duas cepas de *E. coli*, DH5 α e BL21(DE3), para dar início aos ensaios de expressão da proteína mutada. Como precisávamos ter a proteína BDC para comparação das atividades biológicas, também foi feita transformação do plasmídeo pGEX-4T-1-BDC nas duas cepas de *E. coli*. A indução da expressão foi feita com 0,5M de IPTG a 37°C durante 4h. A utilização do plasmídeo pGEX permite a expressão da proteína de interesse em fusão com a Glutathione S-transferase (GST), resultando nesse caso nas proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD. A figura 4.3 mostra um gel de poliacrilamida do processo de indução da expressão das proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD nas cepas DH5 α e BL21(DE3) de *E. coli*. As proteínas em

fusão apresentam massa molecular teórica de aproximadamente 52 kDa. É possível verificar que tanto a GST-BDC quanto a GST-BDC-ACD são expressas em níveis maiores nas células da linhagem BL21(DE3). Portanto esta linhagem foi escolhida para realização da expressão das proteínas em maior escala.

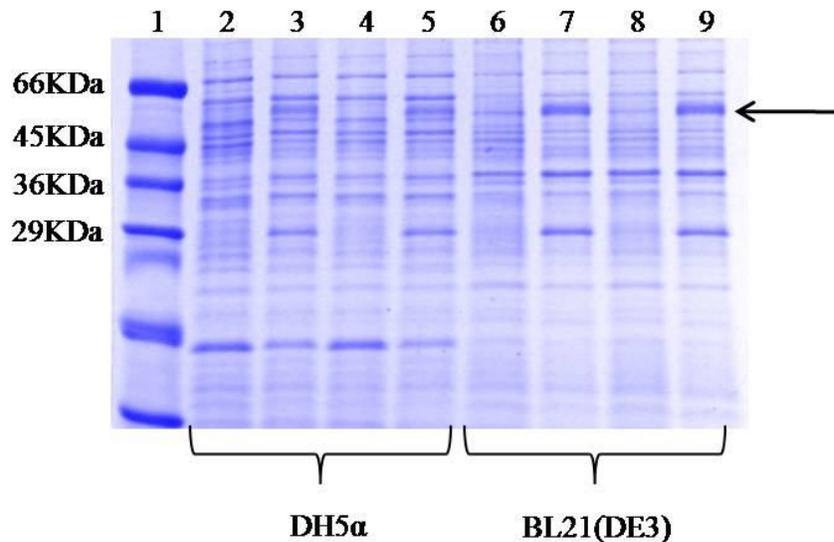


FIGURA 4.3 - Análise em SDS-PAGE 15% dos processos de expressão das proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD nas linhagens DH5 α e BL21(DE3) de *E. Coli*. 1) Marcador de massa molecular; 2 e 4) Cultura de *E. coli* (DH5- α) – controle antes da indução; 3) Cultura de *E. coli* (DH5- α) após 4 horas de indução da expressão da GST-BDC; 5) Cultura de *E. coli* (DH5- α) após 4 horas de indução da expressão da GST-BDC-ACD; 6 e 8) Cultura de *E. coli* BL21(DE3) – controle antes da indução; 7) Cultura de *E. coli* BL21(DE3) após 4 horas de indução da expressão da GST-BDC; 9) Cultura de *E. coli* BL21(DE3) após 4 horas de indução da expressão da GST-BDC-ACD. A seta indica a altura onde se encontram as bandas correspondentes às proteínas em fusão GST-BDC e GST-BDC-ACD, em torno de 52 KDa.

Utilizando a linhagem BL21(DE3) de *E.coli* para a expressão das proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD, a próxima etapa foi verificar a solubilidade das proteínas expressas. As culturas de células induzidas a 37°C por

4h foram centrifugadas e as células foram ressuspensas em tampão e depois lisadas por ultrassom. Após a lise celular as frações solúvel e insolúvel foram analisadas em gel de poliacrilamida em condições denaturantes (figura 4.4). Como pode ser avaliado pela figura tanto a BDC quanto a BDC-ACD em fusão com a GST são expressas de forma pouco solúvel sob essas condições, pois as fortes bandas, em torno de 52 KDa, presentes nas frações precipitadas (insolúveis) (poços 3 e 6 da figura 4.4), são muito fracas nas frações solúveis (poços 4 e 7 da figura 4.4).

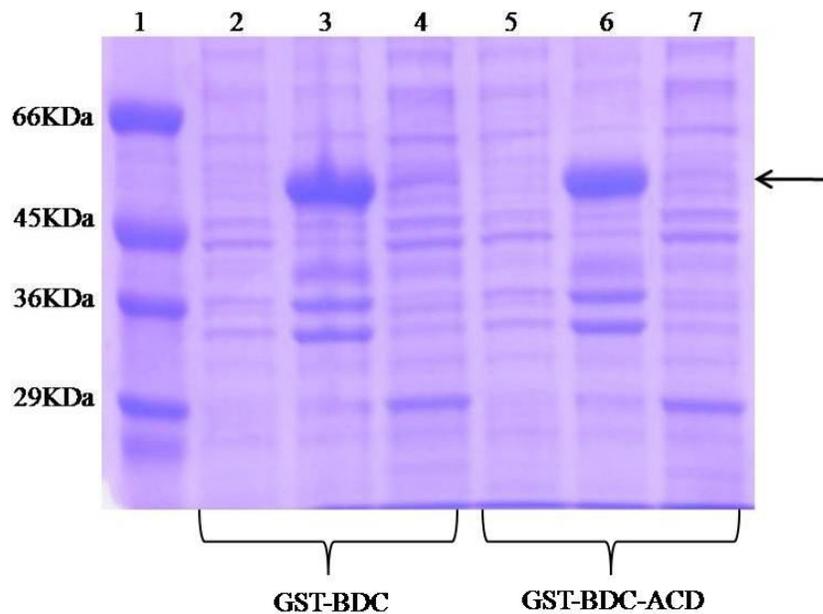


FIGURA 4.4 - Análise em SDS-PAGE 15% da solubilidade das proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD expressas em *E. coli* BL21(DE3) a 37°C por 4 horas. 1) Marcador de massa molecular; 2) Cultura de *E. coli* BL21(DE3) – controle antes da indução da GST-BDC; 3) cultura celular induzida para expressão de GST-BDC após lise: precipitado; 4) cultura celular induzida para expressão de GST-BDC após lise: sobrenadante; 5) Cultura de *E. coli* BL21(DE3) – controle antes da indução da GST-BDC-ACD; 6) cultura celular induzida para expressão de GST-BDC-ACD após lise: precipitado; 7) cultura celular induzida para expressão de GST-BDC-ACD após lise: sobrenadante.

Tendo em vista a baixa solubilidade das proteínas, sob as condições de indução da expressão até então realizadas, foi testada a realização da indução à 20°C, durante 16 horas. Observamos um aumento bastante expressivo de proteína solúvel tanto para GST-BDC quanto para a GST-BDC-ACD (poços 4 e 7 da figura 4.5).

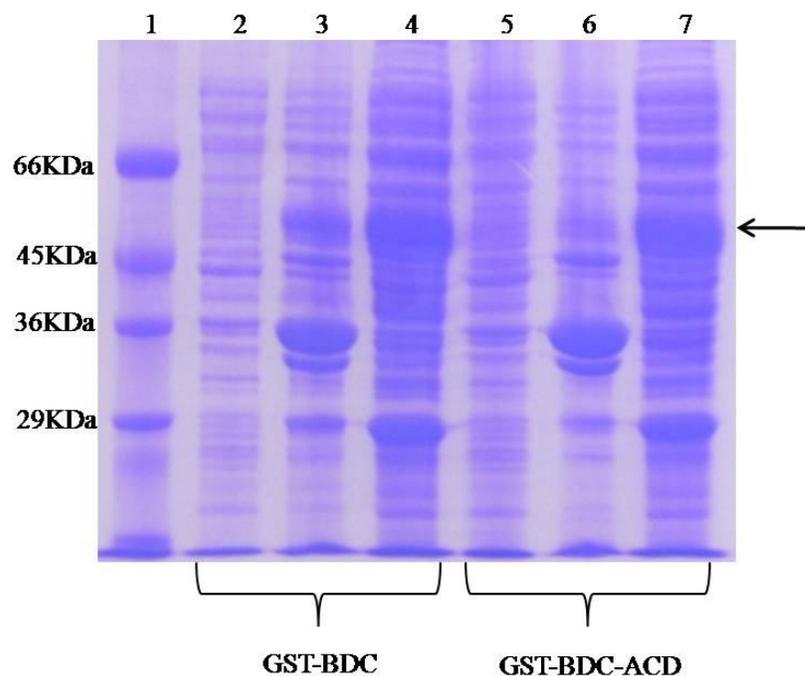


FIGURA 4.5 - Análise em SDS-PAGE 15% da solubilidade das proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD expressas em *E. coli* BL21(DE3) a 20°C por 16 horas. 1) Marcador de massa molecular; 2) Cultura de *E. coli* BL21(DE3) – controle antes da indução da GST-BDC; 3) cultura celular induzida para expressão de GST-BDC após lise: precipitado; 4) cultura celular induzida para expressão de GST-BDC após lise: sobrenadante; 5) Cultura de *E. coli* BL21(DE3) – controle antes da indução da GST-BDC-ACD; 6) cultura celular induzida para expressão de GST-BDC-ACD após lise: precipitado; 7) cultura celular induzida para expressão de GST-BDC-ACD após lise: sobrenadante.

4.2.2. Purificação e caracterização das proteínas clivadas

A fusão da proteína de interesse com a Glutathione S-Transferase (GST), decorrente da utilização do plasmídeo pGEX-4T-1, é interessante pois a GST, por ser bastante solúvel, pode contribuir para que uma quantidade maior da proteína de interesse fique na fração solúvel após a lise das células. Além disso, GST tem afinidade pela resina Glutathione Sepharose, o que faz com que a expressão das proteínas em fusão com GST seja também uma estratégia para posterior purificação das mesmas. Deste modo, é esperado que as proteínas em fusão se liguem à resina através da GST, facilitando a purificação.

As proteínas em fusão (GST-BDC e GST-BDC-ACD) têm um sítio de clivagem para trombina, que permite a obtenção das proteínas de interesse sem estarem ligadas com a GST. Foi adotada, como metodologia para separar as proteínas em fusão, fazer a clivagem das proteínas imobilizadas na resina, com a intenção de agilizar e simplificar a purificação das proteínas da melhor maneira possível diminuindo ao máximo o número de etapas do processo e, conseqüentemente, a provável perda no rendimento. Além disso, as dificuldades de se separar as proteínas BDC e BDC-ACD da GST após a eluição com glutathione reduzida, também influenciaram a opção pela clivagem na própria resina. Foi estudada a possibilidade de separar as proteínas através de cromatografia por exclusão molecular, no entanto, devido à proximidade de suas massas moleculares (cerca de 26 kDa para GST e cerca de 24 kDa para BDC e BDC-ACD), concluiu-se que esta técnica seria imprópria para separação destas moléculas. O uso da cromatografia de troca iônica também seria ineficiente, uma vez que os valores de ponto isoelétrico calculados para estas proteínas são muito próximos (5,0 para GST, 4,87 para BDC e 4,94 para BDC-ACD).

A clivagem com trombina das proteínas em fusão (GST-BDC e GST-BDC-ACD) immobilizadas na resina foi realizada com sucesso. Através de análise por SDS-PAGE, podemos constatar a presença de duas bandas, uma em torno de 30 kDa, a qual atribuímos ser BDC/BDC-ACD e outra, em torno de 26 kDa, que pressupomos, pelo tamanho, ser GST (figura 4.6).

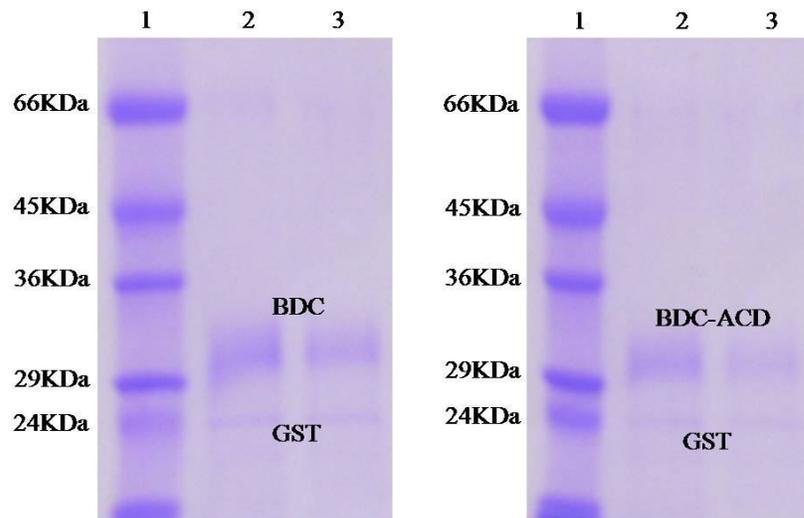


FIGURA 4.6 - Análise em SDS-PAGE 15% das frações recolhidas após clivagem das proteínas GST-BDC e GST-BDC-ACD immobilizadas na resina. 1) Marcador de Massa molecular; 2 e 3) Frações recolhidas após a clivagem.

Embora a massa molecular teórica da BDC e BDC-ACD seja de aproximadamente 24 kDa, é característico da botropasina-C aparecer no gel em uma banda em torno de 30 kDa (ASSAKURA *et al*, 2003). Isso também é verificado para os domínios DC de outras PIII-SVMPs, como a jararagina-C (MOURA-DA-SILVA *et al*, 1999). Essa diferença entre a massa molecular teórica e a massa molecular aparente no gel pode ser atribuída à própria eletroforese que, embora seja uma metodologia bastante útil e amplamente utilizada, é relativamente imprecisa, de modo que, mesmo havendo passado por processo de denaturação as proteínas podem não ‘correr’ somente em função da

massa, como é o esperado. Portanto, a resolução do gel também pode ser influenciada pela estrutura terciária das proteínas.

O rendimento aproximado, por litro de meio de cultura, foi de 280 mg para BDC e 240 mg para BDC-ACD.

A caracterização das proteínas recombinantes BDC e BDC-ACD e também da proteína que foi eluída da coluna com glutathione reduzida (teoricamente a GST) foi feita pelo método de *western blotting*. Como a massa molecular estimada das proteínas de interesse, BDC e BDC-ACD, e da GST, são muito próximas (aproximadamente 30kDa) era fundamental que se pudesse caracterizar as proteínas de forma a identificá-las. Nesta análise, as amostras foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose que foi incubada com anticorpos apropriados. Para detecção das proteínas BDC e BDC-ACD a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-botropasina seguido de incubação com o anti-IgG de coelho. Para a detecção de GST a membrana foi incubada com o anticorpo anti-GST seguido de incubação com o anti-IgG de camundongo. As figuras 4.7 e 4.8 mostram os géis de eletroforese e a membrana de nitrocelulose após revelação, para os experimentos com BDC e BDC-ACD, respectivamente. O anticorpo anti-botropasina reconheceu a banda em torno de 30 kDa, confirmando a presença das proteínas de interesse BDC e BDC-ACD (Figuras 4.7-B e 4.8-B). O anticorpo anti-GST, reconheceu a banda em torno de 26 kDa nas frações eluídas com glutathione reduzida, o que pode ser verificado tanto para BDC, quanto para BDC-ACD (Figuras 4.7-C e 4.8-C). Deste modo, foi possível confirmar que as bandas em torno de 26 kDa, presentes nas frações recolhidas após a clivagem (poço 6 das figuras 4.7-C e 4.8-C), de fato correspondem à GST e que a banda de massa molecular próximo de 30kDa corresponde à BDC e à BDC-ACD.

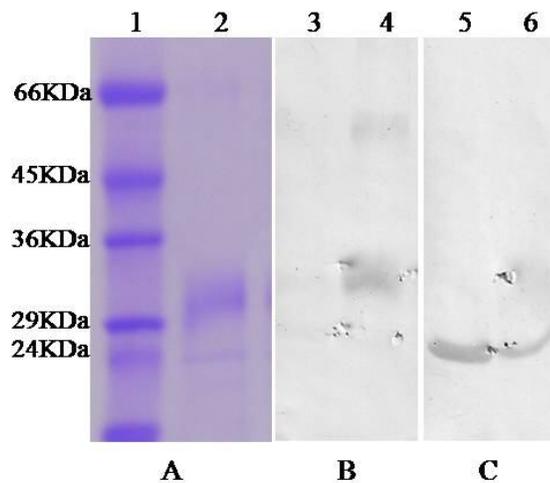


FIGURA 4.7 - Caracterização por *western blotting* da proteína BDC obtida após a clivagem na resina. (A) SDS-PAGE 15%. (B) Membrana de nitrocelulose incubada com anticorpo anti-botropasina de coelho. (C) Membrana de nitrocelulose incubada com anticorpo anti-GST de camundongo. 1) Marcador de massa molecular; 2, 4 e 6) frações recolhidas após a clivagem; 3 e 5) frações recolhidas após a eluição com glutathiona reduzida.

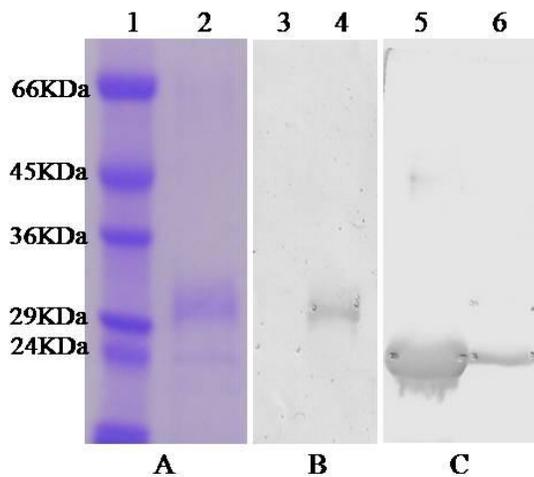


FIGURA 4.8 - Caracterização *western blotting* da proteína BDC-ACD obtida após a clivagem na resina. (A) SDS-PAGE 15%. (B) Membrana de nitrocelulose incubada com anticorpo anti-botropasina de coelho. (C) Membrana de nitrocelulose incubada com anticorpo anti-GST de camundongo. 1) Marcador de massa molecular; 2, 4 e 6) frações recolhidas após a clivagem; 3 e 5) frações recolhidas após a eluição com glutathiona reduzida.

Através da análise por *western blotting* detectamos que as frações eluídas da coluna de afinidade contendo as proteínas BDC e BDC-ACD encontram-se com um contaminante - a proteína GST (o que foi verificado pela reação positiva com o anticorpo anti-GST). Assim, para tentar eliminar esse contaminante, as amostras contendo BDC e BDC-ACD foram reaplicadas na coluna de *Glutathione Sepharose* por mais duas vezes. Após a reincubação com a resina, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel corado com nitrato de prata, cuja capacidade de detecção é maior - 0,1 a 1,0 ng de proteína - enquanto a sensibilidade do *Comassie Brilliant Blue* é de 100 ng de proteína (PATTON, 2002). A estratégia utilizada para retirada da GST contaminante foi eficaz, permitindo a obtenção de proteínas com grau de pureza alto conforme mostra a figura 4.9.

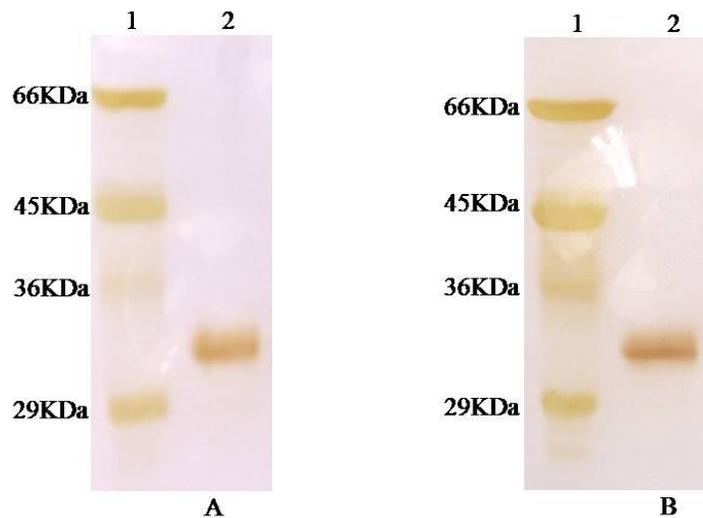


FIGURA 4.9 - Análise em SDS-PAGE 15% das frações clivadas reaplicadas na resina. (A) Amostra referente à BDC. (B) Amostra referente à BDC-ACD. 1) Marcador de massa molecular; 2) Amostras de BDC e BDC-ACD clivadas na coluna de afinidade, eluídas e reaplicadas na mesma coluna.

4.2.3. Purificação das proteínas em fusão com GST

As proteínas de interesse também foram obtidas em fusão com GST através da eluição direta da resina, sem a etapa de clivagem com trombina. A análise eletroforética (figura 4.10) das frações eluídas da coluna, mostra a presença de uma forte banda em torno de 52 kDa, correspondente às proteínas em fusão GST-BDC e GST-BDC-ACD.

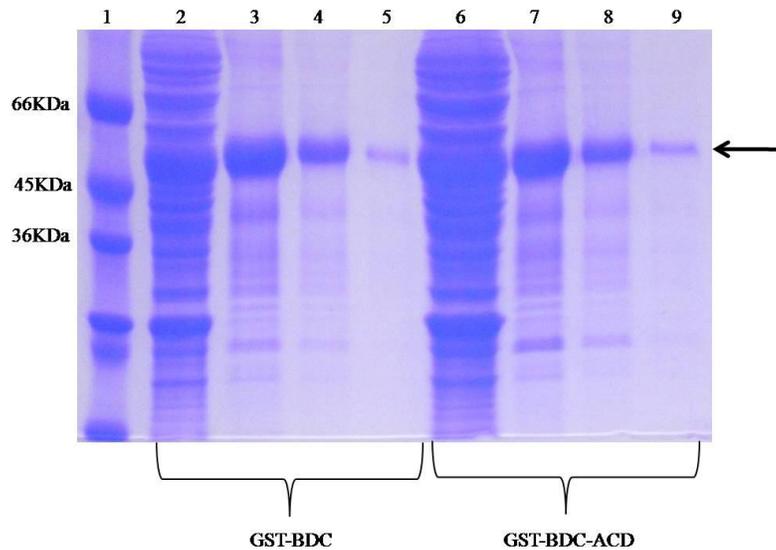


FIGURA 4.10 - Análise em SDS-PAGE 15% das frações eluídas da coluna de afinidade com glutathiona reduzida das amostras de GST-BDC e GST-BDC-ACD. 1) Marcador de massa molecular; 2) Cultura celular induzida para expressão de GST-BDC após lise: sobrenadante; 3-5) Frações eluídas com glutathiona reduzida- amostra de GST-BDC; 6) Cultura celular induzida para expressão de GST-BDC-ACD após lise: sobrenadante; 7-9) Frações eluídas com glutathiona reduzida- amostra de GST-BDC-ACD.

Também é observada a ocorrência de várias bandas de contaminantes abaixo de 52 kDa. Inicialmente, atribuiu-se estas bandas à

presença de proteases no meio de cultura. Na tentativa de sanar este problema, inibidores de protease (PMSF, leuptina, EDTA e pepstatina), foram adicionados ao tampão de lise, porém, não houve modificação no padrão de bandas. Cromatografia por exclusão molecular também foi usada para remoção das moléculas indesejadas mas devido à proximidade das massas, a maioria destas bandas ainda era encontrada no gel. Conforme mostra a figura 4.10, obteve-se uma quantidade apreciável de proteína após a eluição, e a banda em torno de 52 kDa é bem mais forte que as outras, indicando que a concentração das proteínas com essa massa é bem superior em relação às outras. Deste modo, com sucessivas lavagens com tampão após a eluição, conseguimos resgatar uma quantidade razoável das proteínas de interesse (450 mg.L^{-1}), com um grau de pureza aceitável (poços 5 e 9 da figura 4.10).

4.3. Ensaios de inibição da adesão celular

As proteínas obtidas foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir a adesão de células de adenocarcinoma da mama da linhagem MDA-MB-231 ao colágeno tipo I. Esta linhagem foi selecionada por expressar a subunidade $\alpha 2$ de integrinas, e que interage com membros da classe PIII das SVMPs (RIBEIRO, 2009). Por outro lado, a escolha do colágeno I baseia-se em estudos demonstrando que as integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_1\beta_1$ interagem com este ligante (KNIGHT *et al.*, 2000; EMSLEY *et al.*, 2000; NYKVIST *et al.*, 2000).

As proteínas clivadas BDC e BDC-ACD, e também as proteínas em fusão GST-BDC e GST-BDC-ACD não apresentaram, em nenhuma concentração (variando de 1 a 10000 nM), atividade de inibição da adesão celular nas condições testadas.

Em um estudo com anticorpos monoclonais para as subunidades α_2 e β_1 , KAMIGUTI e colaboradores (1996) verificaram que a inibição da agregação plaquetária pela jararagina, uma homóloga da botropasina, ocorre pela ligação da porção DC à subunidade α_2 , seguida da proteólise da subunidade β_1 pelo domínio catalítico (metaloprotease), causando a perda da conformação da integrina necessária para a ligação de ligantes macromoleculares. Outro estudo, realizado por SOUZA *et al.* (2000) mostrou que alternagina e alternagina-C inibem adesão de células K562 transfectadas com integrinas $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno, porém não foram capazes de inibir a adesão de células que expressam integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_9\beta_1$ a outros ligantes como fibrinogênio, fibronectina e colágeno tipo IV.

Os dois estudos citados acima sugerem que interações de PIII-SVMPs com integrinas ocorram através da subunidade α_2 . Não há relatos na literatura de estudos de inibição da adesão celular realizados com botropasina. Como os resultados de inibição de adesão foram negativos tanto para BDC quanto para BDC-ACD, ensaios de citometria de fluxo, realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, foram feitos com a linhagem celular MDA-MB-231. Esses estudos, mostraram que essas células apresentaram em sua superfície as subunidades, β_4 , β_1 , α_5 , α_V e α_6 de integrinas, a integrina $\alpha_V\beta_5$, e em menor proporção a integrina $\alpha_V\beta_3$ e a subunidade α_4 e não apresentam a subunidade α_2 . Não se sabe ao certo o porquê da não expressão da subunidade α_2 pelas células, mas os resultados aqui obtidos indicam que os domínios DC da botropasina também devem interagir com as integrinas através desta subunidade na inibição da adesão ao colágeno. Estudos de inibição de adesão utilizando outros tipos celulares que expressem diferentes integrinas, e outras proteínas de matriz além do colágeno, podem indicar a especificidade das interações da botropasina com as integrinas.

4.4. Ensaio de inibição da agregação plaquetária

As duas proteínas obtidas, BDC e BDC-ACD foram testadas quanto a sua capacidade de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno.

As plaquetas são frequentemente associadas à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que age como mediadora da agregação plaquetária através da interação com o motivo RGD presente em alguns componentes da MEC, como fibronectina e vitronectina (PLOW *et al.*, 2000; LUO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007). Contudo, as plaquetas também expressam em sua membrana, receptores $\alpha_2\beta_1$ que promovem a agregação plaquetária através da interação com o colágeno. As desintegrinas RGD (PII-SVMP) são capazes de inibir a agregação plaquetária agindo como antagonistas para $\alpha_{IIb}\beta_3$. Os domínios DC das PIII-SVMPs, que apresentam o motivo ECD no lugar do RGD, têm demonstrado, capacidade de inibir agregação plaquetária, induzida por colágeno e mediada por receptores $\alpha_2\beta_1$ (USAMI *et al.*, 1994; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1999; KAMIGUTI *et al.*, 1996; ASSAKURA *et al.*, 2003, SILVA *et al.*, 2004).

As moléculas de colágeno são, em sua maioria, constituídas por três cadeias, denominadas cadeias α , arranjadas em uma tripla hélice. Cada cadeia contém repetições de uma sequência característica de aminoácidos, formadas por Gly-X-Y, onde X e Y pode ser qualquer aminoácido, mas X frequentemente é uma prolina e Y, uma hidroxiprolina (CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2001). Como mencionado anteriormente, algumas subunidades α de integrina (α_1 , α_2 , α_{10} , α_{11} , α_D , α_E , α_L , α_M , α_X), possuem o domínio α I, que antecede o domínio β -propulsor na subunidade α . Estudos cristalográficos mostram que colágenos do tipo I e IV interagem com integrinas $\alpha_2\beta_1$ (e também com $\alpha_1\beta_1$) através do motivo GFOGER (glicina, fenilalanina, hidroxiprolina, glicina, ácido

glutâmico, arginina) presente no colágeno, que é reconhecido pelo domínio α I das subunidades α de integrinas citadas acima (KNIGHT *et al.*, 2000; EMSLEY *et al.*, 2000; NYKVIST *et al.*, 2000). Essa ligação ocorre entre o glutâmico do motivo GFOGER do colágeno e o íon metálico divalente do sítio de adesão dependente de íon metálico (MIDAS), localizado no domínio α I das subunidades α_1 ou α_2 de integrinas. Controversamente, JIA e colaboradores verificaram que células MG-63 pré-incubadas com anticorpo monoclonal anti- β_1 perdem sua capacidade de ligação ao colágeno tipo I, sugerindo que a subunidade β_1 estaria envolvida nesta interação (JIA *et al.*, 2000).

Nos ensaios de inibição da agregação plaquetária realizados neste trabalho o PRP, preparado a partir de sangue humano fresco, foi incubado com as proteínas a serem testadas por 2 minutos para que as proteínas pudessem interagir com os receptores e em seguida adicionou-se colágeno para que a agregação plaquetária fosse induzida.

Nos primeiros testes realizados, observou-se a ocorrência de agregação plaquetária durante a incubação do plasma com as proteínas que estavam sendo avaliadas antes mesmo da adição de colágeno. A causa desta agregação “indevida” foi a presença de trombina, em uma quantidade relativamente alta, nas amostras testadas. A trombina presente nas amostras era proveniente das reações de clivagem realizadas para separar as proteínas de interesse da proteína de fusão (GST). Com o objetivo de retirar a trombina, as amostras foram aplicadas em uma coluna de benzamidina (GE Healthcare) que possui afinidade por trombina. Era esperado que a trombina ficasse retida na coluna e as demais proteínas passassem por ela sem que houvesse ligação. Ou, ainda, se houvesse alguma interação iônica, esperava-se que as proteínas de interesse fossem eluídas com solução de NaCl. No entanto, tanto BDC quanto BDC-ACD ficaram retidas na coluna e não foi possível recuperá-las sem a utilização de uma solução denaturante. Presume-se a ocorrência de alguma

interação não iônica entre os grupos imobilizados na resina da coluna e as proteínas de interesse.

Outra tentativa para retirar a trombina foi aplicar as amostras em uma coluna de troca catiônica, SPFF (GE Healthcare). O valor teórico de pI para a trombina é 7,0 e para BDC e BDC-ACD é em torno de 4,9. Com base nessa diferença entre os valores de pI, em pH 6,0, a trombina teria carga positiva e, portanto ficaria ligada à coluna através de interações iônicas, e as proteínas de interesse teriam carga negativa e não iriam se ligar a coluna de troca catiônica. No entanto, esta tentativa não foi eficiente para separar a trombina das amostras, o que pôde ser verificado através do próprio teste de agregação plaquetária, em que continuou ocorrendo agregação antes mesmo da adição de colágeno. O pI teórico foi calculado com o auxílio do software Compute pI/Mw disponível em http://ca.expasy.org/cgi-bin/pi_tool. Esse cálculo é baseado na somatória das cargas dos aminoácidos presentes na sequência de aminoácidos da proteína analisada, sem levar em conta seu real enovelamento, o que poderia explicar o comportamento inesperado de determinadas proteínas frente aos seus valores de pI teóricos. A influência da estrutura tridimensional incide sobre aminoácidos que isoladamente deveriam adquirir uma carga positiva ou negativa em uma determinada condição de pH, mas que, dentro da macromolécula, não estão acessíveis ou estão envolvidos em interações com outros grupos dentro da própria molécula.

Finalmente, a solução para o problema da trombina veio através de modificações, de certa forma sutis, na metodologia de purificação. As amostras com excesso de trombina estavam sendo purificadas por um procedimento que se diferencia, em alguns aspectos, da metodologia descrita no item 3.2: uma quantidade maior de resina (1,5 mL ao invés de 350 µL) era incubada com 50 mL (ao invés de 10 mL) do sobrenadante obtido após a centrifugação do lisado celular e a clivagem era feita com 15 U de trombina. O padrão das amostras

obtidas desta forma, analisadas por eletroforese, era semelhante ao das obtidas pelo procedimento atual. Contudo, a concentração dessas amostras após a clivagem era menor, de tal maneira que, amostras provenientes de três reações de clivagem eram reunidas e concentradas, com o uso de Centricon (Milipore). Esse procedimento fez com que fossem concentradas não só as proteínas de interesse mas também a trombina, que então, encontrava-se em uma concentração capaz de interferir nos ensaios de agregação plaquetária. Utilizando a metodologia atual (item 3.2), foram obtidas proteínas clivadas com uma quantidade menor de trombina e em uma concentração apreciável de BDC/BDC-ACD, sem que houvesse a necessidade de concentrar as amostras. Embora a trombina não tenha sido retirada, os ensaios não mais foram afetados por sua presença, dada a sua baixa concentração nas amostras.

A trombina afeta os ensaios de agregação plaquetária por ser um elemento essencial na formação do coágulo. O processo de coagulação é iniciado por uma cascata de sinalização envolvendo diversos fatores, existentes no plasma, onde se forma um complexo ativador da protrombina. Este complexo, juntamente com íons Ca^{2+} e fosfolipídios plaquetários, transformam protrombina em trombina. A trombina atua proteoliticamente sobre o fibrinogênio dando origem a monômeros de fibrina que, posteriormente, irão se polimerizar formando fibras de fibrina, que por sua vez são estabilizadas por um fator estabilizador das fibras de fibrina, o qual também é ativado pela trombina (figura 4.11). Em função da ação da trombina sobre a própria protrombina e sobre alguns fatores de coagulação responsáveis pela formação da protrombina, tem-se que, uma vez formada uma quantidade crítica de trombina, desenvolve-se um ciclo vicioso que provoca mais coagulação e formação de cada vez mais trombina (GUYTON & HALL, 2002).

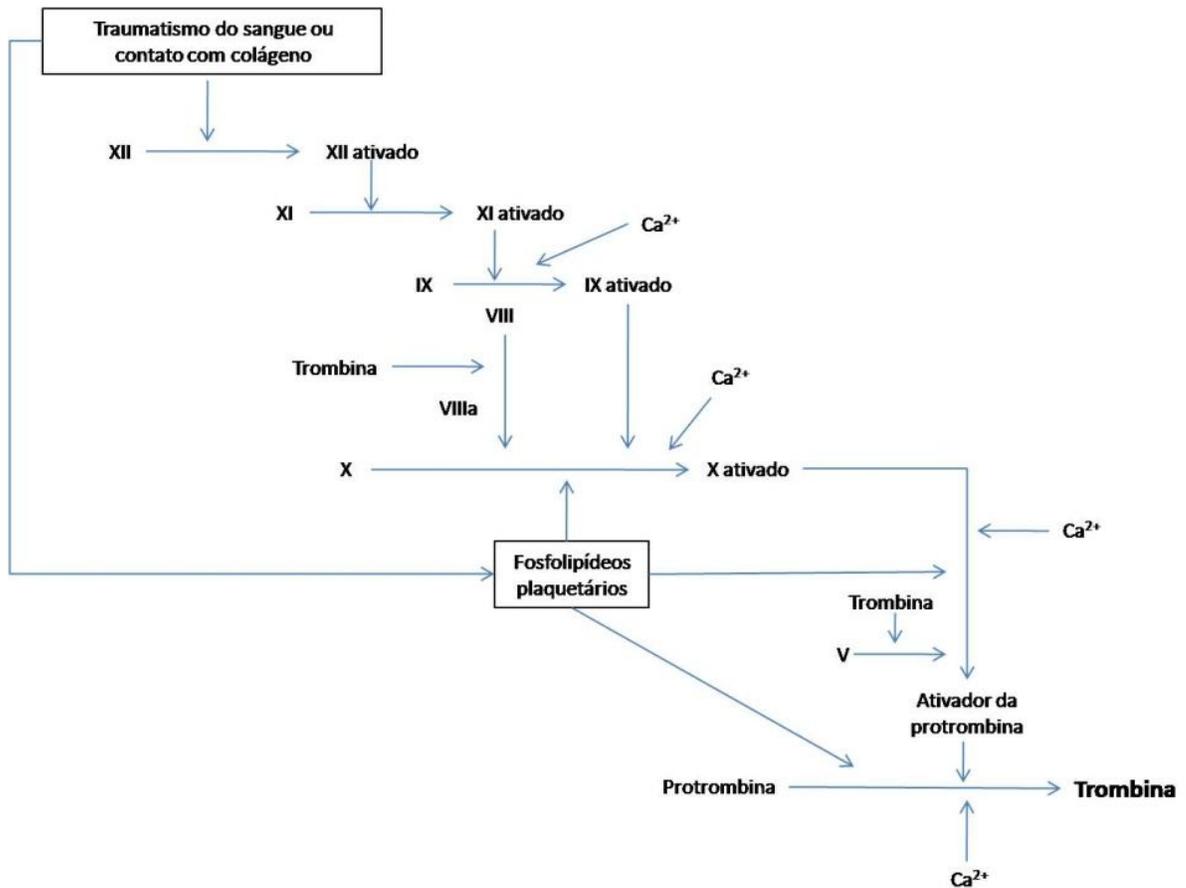


FIGURA 4.11 – Diagrama esquemático da via intrínseca para o início da coagulação sanguínea (GUYTON & HALL, 2002).

Nos ensaios de inibição da agregação plaquetária realizados nesse trabalho, foi verificado que na concentração de 1,0 μM , BDC foi capaz de inibir $34 \pm 4,2 \%$ da agregação plaquetária e a BDC-ACD inibiu $30 \pm 4,4 \%$. Na concentração de 2,0 μM , os resultados foram $45 \pm 1,3\%$ e $47 \pm 3,1\%$ para BDC e BDC-ACD, respectivamente. Os resultados estão representados no gráfico da figura 4.12.

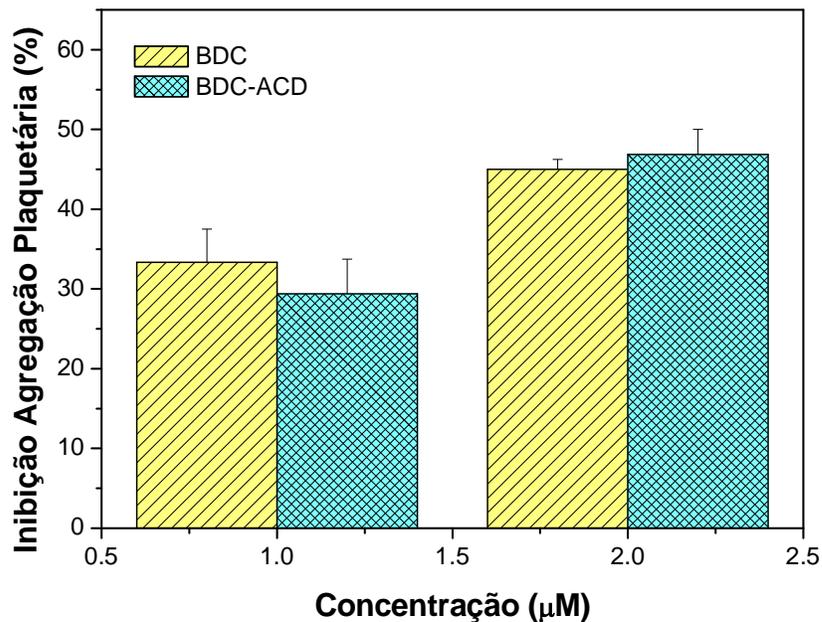


FIGURA 4.12 – Gráfico da inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno pelas proteínas BDC e BDC-ACD.

Os valores de inibição da agregação plaquetária obtidos para BDC e BDC-ACD, na concentração 1 μM indicam que a capacidade de inibição da proteína selvagem é um pouco maior que a da proteína mutante (inibiu 4,0 % a mais). Contrariamente, na concentração 2 μM , a proteína mutante se mostrou mais ativa que a proteína selvagem, contudo, a diferença de valor foi ainda menor (inibiu 2,0 % a mais). Portanto, de modo geral, observa-se que os valores obtidos nos testes de agregação (e considerando os erros associados a eles) são bem próximos, sugerindo que a mutação no motivo ECD do domínio tipo-desintegrina, não afetou significativamente a atividade dos domínios DC da botropasina. Portanto, nossos resultados evidenciam que o glutâmico presente no motivo ECD, não está envolvido diretamente na interação da proteína botropasina com a integrina $\alpha_2\beta_1$.

A proteína em fusão GST-BDC também foi testada quanto a sua capacidade de inibir a agregação plaquetária, no entanto, diferentemente de GST-HF3-DC (MENEZES *et al*, 2010), não apresentou atividade. Deste modo, pressupõe-se que a GST interage com a BDC de tal maneira que esta interação esteja encobrindo regiões importantes para ligação da BDC à outras moléculas do meio.

Até o presente momento não há nenhum estudo na literatura em que tenha sido descrito a obtenção dos domínios DC de uma PIII-SVMP em que o glutâmico do motivo ECD foi substituído. MENEZES *et al.* (2010) relatam terem feito mutação nos resíduos Glu e Asp do ECD da PIII-SVMP DC-HF3, porém a proteína mutada no resíduo Glu não foi obtida na forma solúvel. Isso pode ser visto como um indicativo de que o resíduo Glu do motivo ECD tem uma importância distinta em diferentes PIII-SVMPs. Contudo, seu papel não estaria relacionado com a ligação às integrinas e sim com a estabilização da estrutura da proteína. A substituição de Glu por Ala no ECD da DC-HF3 alterou a conformação de maneira drástica, tornando-a insolúvel, contudo, a mesma substituição, não alterou significativamente nem a solubilidade, nem a atividade inibitória da agregação plaquetária da botropasina-C, presumindo-se, portanto, que não houve alteração significativa de sua estrutura.

DC-HF3 mutada no resíduo Asp, por outro lado, foi obtida na forma solúvel e apresentou uma atividade significativamente menor na inibição da agregação plaquetária (MENEZES *et al*, 2010). Considerando que o Asp do ECD atua na ligação de um dos sítios de ligação ao Ca^{2+} , que tem um papel importante na estabilização da proteína, é possível que a diferença observada na capacidade de inibição da agregação tenha ocorrido devido à perda parcial da conformação ativa da proteína.

Considerando que apenas os domínios DC das PIII-SVMPs, incluindo a jararagina (USAMI *et al.*, 1994), são suficientes para inibir a agregação plaquetária, fica claro que a ligação dessas proteínas às integrinas impedem a ligação do colágeno às integrinas. Por outro lado, MOURA-DA-SILVA e colaboradores (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2008) apontam um motivo sequencial da molécula como responsável pela interação da jararagina com o colágeno. Este motivo está inserido em uma região denominada subdomínio-Da da molécula, que faz parte do domínio D (tipo-desintegrina) da jararagina. Também foi sugerido que a interação com o colágeno é importante para atividade hemorrágica das PIII-SVMPs, uma vez que estas possuem essa mesma região não conservada. Além disso, estudos posteriores mostraram que estas interações com o colágeno são suficientes para inibir a agregação plaquetária (TANJONI *et al.*, 2010). O subdomínio-Da desintegrina está representado abaixo:

GSQCGHGDCCCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFKK

O motivo apontado como responsável pela interação com o colágeno está destacado em negrito. Observa-se que o motivo ECD está inserido dentro do motivo destacado.

Foi verificado ainda que a região da jararagina que se liga ao colágeno não é a mesma que se liga às integrinas $\alpha_2\beta_1$ (TANJONI *et al.*, 2010). Deste modo verificamos que a inibição da agregação plaquetária por PIII-SVMPs não necessariamente ocorre devido à ligação ao receptor $\alpha_2\beta_1$, podendo ocorrer em decorrência da ligação ao colágeno. No caso de BDC e BDC-ACD, independente da ligação que esteja ocorrendo, os valores obtidos em nossos ensaios mostraram que o glutâmico do ECD não interfere na ligação e, portanto, não contribuiu para o efeito de inibição observado nas proteínas.

Se assumirmos que o motivo ECD do domínio tipo-desintegrina não está diretamente envolvido com a ligação na interação das PIII-SVMPs poderíamos então pressupor que estas interações ocorrem por meio da região HVR. No entanto, esta também seria uma conclusão precipitada. Primeiramente, temos que considerar que nem todas as PIII-SVMPs possuem uma região hiper variável (como foi mostrado no item 1.3 da introdução), em algumas PIII essa região é bem conservada. Contudo, de fato, o domínio C das PIII-SVMPs tem sido apontado como uma região importante na interação dessas proteínas com os receptores $\alpha_2\beta_1$ (sendo ela correspondente a região hiper variável ou não).

Um estudo com domínios recombinantes C (rico em cisteínas) e D (desintegrina) da HF3 em fusão com GST, mostrou que o domínio C apresentou grande potencial de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno (cerca de 88%, na concentração de 0,5 μM), em contra partida, para o domínio D a inibição máxima foi em torno de 25 % na concentração de 2 μM , evidenciando a relevância do domínio C nestas interações (MENEZES, *et al* 2010).

JIA *et al* (1997) mostraram que os domínios DC da atrolisina A recombinante (A/DC), inibem a agregação plaquetária induzida por colágeno e por ADP. Em um estudo posterior foi observado que somente o domínio C da atrolisina A também foi capaz de inibir agregação plaquetária induzida por colágeno, mas não inibiu a agregação induzida por ADP, sugerindo que a porção rica em cisteína dessa proteína tenha especificidade de ligação para o receptor $\alpha_2\beta_1$ (JIA *et al*, 2000).

Em ensaios de inibição da adesão celular mediada por colágeno, realizado com células K562 transfectadas com subunidade α_2 de integrinas, o domínio 'rico em cisteína' (C) da jararagina não exibiu a capacidade de inibir a adesão das células porém, inesperadamente, um fragmento contendo somente a

região hiper variável do domínio C demonstrou ser ativo neste ensaio. Essa diferença foi considerada uma consequência do enovelamento e da extensão em que os resíduos estão expostos e disponíveis para interagir com outras moléculas (TANJONI, *et al* 2010).

A análise de todos os estudos citados mostra que as PIII-SVMPs possuem diferentes regiões capazes de se ligar a ligantes distintos, que a atividade dessas proteínas depende muito de sua estrutura tridimensional e sugere que a maneira pela qual a estrutura tridimensional é afetada por mudanças é variável entre as proteínas pertencentes a esta classe, sendo, portanto, difícil fazer generalizações a respeito da relação estrutura-função destas proteínas.

5. CONCLUSÕES

A metodologia empregada na mutação sítio dirigida foi bem sucedida, pois a troca do resíduo glutâmico no motivo ECD do domínio tipo-desintegrina da botropasina pelo resíduo alanina foi realizada com eficiência.

A metodologia empregada na expressão e purificação das proteínas recombinantes BDC e BDC-ACD foi eficiente, uma vez que foram obtidas quantidades razoáveis de proteína por litro de meio de cultura (280 mg para BDC e 240 mg para BDC-ACD) com grau de pureza satisfatório e, a obtenção das proteínas esperadas foi confirmada por *western blotting*.

Os ensaios de inibição da adesão celular sugerem que, assim como outras PIII-SVMPs, a botropasina deve inibir a adesão celular ao colágeno através de interação com a subunidade α_2 de integrinas, o que deve ser confirmado por experimentos.

Os ensaios de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno indicaram que o resíduo glutâmico do motivo ECD do domínio tipo-desintegrina da botropasina não interage com integrina $\alpha_2\beta_1$, provocando o efeito de inibição da agregação. Contudo, ainda não está clara a influência deste resíduo sobre a interação da botropasina-C com o colágeno, que também deve afetar a agregação plaquetária, assim como ocorre para jararagina (uma isoforma da botropasina).

Em suma, a região de interação dos domínios tipo-desintegrina (D) e rico em cisteína (C) das PIII-SVMPs, em especial da botropasina, com os receptores $\alpha_2\beta_1$ ainda não foi determinada. Contudo, o estudo apresentado nesse trabalho contribuiu com informações que podem direcionar novos estudos na busca pelo entendimento desta interação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. *Fisiologia*. 1ª. Edição. Ed. Guanabara Koogan, 1999, p. 155-160.
- ALBERTS, B.; ALEXANDER, J.; JULIAN, L.; MARTIN, R.; KEITH, R. & PETER, W. “Biologia Molecular da Célula”. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 1090-1117.
- ASSAKURA, M.; SILVA, C.; REINHARD, M.; CAMARGO, A. & SERRANO, S. “Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*.” *Toxicon* **41**: 217-227, 2003
- AYAD, S.; RAY, P.; BOOT-HANDFORD, M.; HUMPHRIES, J.; KADLER, K. & SHUTTLEWORTH, A. *The Extracellular Matrix Facts Book*. Second Edition. Academic Press, 1998, p. 3.
- BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. “Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms.” *Pharmacology & Therapeutics* **62** (3): 325-372, 1994
- BRADFORD, M M. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.” *Analytical Biochemistry* **72** (1-2): 248-254. 1976
- CARVALHO, H. F & RECCO-PIMENTEL, S. M. *A Célula*. 1a. Edição. Ed. Manole Ltda, 2001, p. 217-220.
- COX, D.; BRENNAN, M. & MORAN, N. “Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities.” *Nature Reviews Drug Discovery* **9** (10): 804-820, 2010.
- DEVLIN, T. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. 6a. Edição. Ed. Edgard Blucher, 2007, p. 967-968.
- EMSLEY, J.; KNIGHT, C. G.; FARNDAL, R. W.; BARNES, M. J. & LIDDINGTON, R. C. “Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha_2\beta_1$.” *Cell* **101** (1):47-56, 2000.
- ESKENS, F.; DUMEZ, H.; HOEKSTRA, R.; PERSCHL, A.; BRINDLEY, C.; BOTTCHER, S.; WYNENDAELE, W.; DREVS, J.; VERWEIJ, J. & VAN OOSTEROM, A. T. “Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a

- novel inhibitor of the integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ in patients with advanced solid tumours." *European Journal of Cancer* **39** (7) 917-926, 2003.
- FLIER, ARJAN VAN DER & SONNENBERG, "A Function and interactions of integrins." *Cell and Tissue Research* **305** (3): 285-298, 2001.
- FOX, J. W. & SERRANO, S. M. "Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases." *Toxicon* **45**: 969-985, 2005.
- FOX, J. W. & SERRANO, S. M. "Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity." *The FEBS journal* **275** (12): 3016-30, 2008.
- FURIE, BRUCE. "Pathogenesis of thrombosis." *Hematology*. 255-258, 2009.
- GAHMBERG, C.; FAGERHOLM, S.; NURMI, S.; CHAVAKIS, T.; MARCHESAN, S. & GRÖNHOLM, M. "Regulation of integrin activity and signalling." *Biochimica et Biophysica Acta* **1790** (6): 431-44, 2009.
- GIANCOTTI, F. G. & RUOSLAHTI, E. "Integrin Signaling." *Science* **285**: 1028-1033, 1999.
- GOMIS-RÜTH, F. X. "Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases." *Molecular Biotechnology* **24**: 157-202, 2003.
- GOULD, R.; POLOKOFF, M.; FRIEDMAN, P.; HUANG, T.; HOLT, J.; COOK, J. & NIEWIAROWSKI, S. "Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **195** (2): 168-171, 1990.
- GRZESIAK, J.J. & BOUVET, M. "Determination of the ligand-binding specificities of the $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 1\beta 1$ integrins in a novel 3-dimensional in vitro model of pancreatic cancer." *Pancreas* **34**(2):220-8, 2007.
- GUTIÉRREZ, J.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T. & DÍAZ, C. "Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage." *Toxicon* **45** (8): 997-1011, 2005.
- GUYTON, A. & HALL, J. *Fisiologia Médica*. 10^a. Edição. Ed. Guanabara Koogan, 2003, p. 394-400.

- HUANG, T.; HOLT, J.; LUKASIEWICZ, H. & NIEWIAROWSKIS, S. "Trigramim. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoproteins IIb-IIIa complex." *The Journal of Biological Chemistry* **262** (33): 16157-16163, 1987.
- HUANG, C.; ZANG, Q.; TAKAGI, J. & SPRINGER, T. "Structural and functional studies with antibodies to the integrin beta 2 subunit. A model for the I-like domain." *The Journal of Biological Chemistry* **275** (28): 21514-24, 2000.
- HYNES, R O. "Integrins: A Family of Cell Surface Receptors." *Cell* **48**: 594-554, 1987.
- HYNES, R O. "Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines." *Cell* **110**: 673-687, 2002.
- JIA, L.; WANG, X.; SHANNON, J.; BJARNASON, J. & FOX, J. "Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists." *The Journal of biological chemistry* **272** (20): 13094-13102, 1997.
- JIA, L.; WANG, X.; SHANNON, J.; BJARNASON, J. & FOX, J. "Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A." *Archives of biochemistry and biophysics* **373**, (1): 281-6, 2000.
- KAMIGUTI, A.; HAY, C. & ZUZEL, M. "Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha_2\beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin" *Biochemistry Journal*. **320**: 635-641, 1996.
- KAMIGUTI, A.; MOURA-DA-SILVA, M.; LAING, G.; KNAPP, T.; ZUZEL, M.; CRAMPTON, J. & THEAKSTON, J. "Collagen-induced secretion-dependent phase of platelet aggregation is inhibited by the snake venom metalloproteinase jararhagin." *Biochimica et Biophysica Acta* **1335** (1-2): 209-217, 1997.
- KAMIGUTI, A.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C.; THEAKSTON, R.; ZUZEL, M. & FOX, J. "Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function." *FEBS Letters* **549**: 129-134, 2003.
- KNIGHT, C.; MORTON, L.; PEACHEY, A.; TUCKWELL, D.; FARNDALE, R. & BARNES, M. "The Collagen-binding A-domains of Integrins $\alpha_1\beta_1$ and

- $\alpha_2\beta_1$ Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (Triple-helical) Collagens.” *The Journal of Biological Chemistry* **275** (1): 35-40, 2000.
- LAEMMLI, U.K. “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. *Nature* **227**:680-685, 1970.
- LODISH, H. *Biologia Celular e Molecular*. 5a. Edição. Ed. Artmed, 2007, p 195-205.
- LU, X.; LU, D.; SCULLY, M. & KAKKAR, V. “The Role of Integrins in Cancer and the Development of Anti-Integrin Therapeutic Agents for Cancer Therapy.” *Medicinal Chemistry*, **44**: 57-73, 2008.
- LUO, B.; CARMAN, C. & SPRINGER, T. “Structural basis of integrin regulation and signaling.” *Annual Review of Immunology* **25**: 619-47, 2007.
- MANDELBAUM, F.; REICHEL, A. & ASSAKURA, M. “Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca).” *Toxicon* **20** (6): 955-972, 1982.
- MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A.; TERRUGGI, C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.; BARJA-FIDALGO, C. & DE FREITAS, M. “Alternagin-C, a non RGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling.” *European Journal of Biochemistry* **270** (24): 4799-4808, 2003.
- MCLANE, M.A.; SANCHEZ, E.E.; WONG, A.; PAQUETTE-STRAUB, C.; PEREZ, J.C. “Disintegrins.” *Current Drug Targets - Cardiovascular & Haematological Disorders* **4**(4):327-55, 2004.
- MENEZES, M.; OLIVEIRA, A.; MELO, R.; LOPES-FERREIRA, M; RIOLI, V.; BALAN, A.; PAES, A. & SERRANO, S. “Biochimie Disintegrin-like / cysteine-rich domains of the reprotolysin HF3 : Site-directed mutagenesis reveals essential role of specific residues.” *Biochimie* **93**(2):345-51, 2011.
- MOURA-DA-SILVA, A; LÍNICA, A.; DELLA-CASA, M.; KAMIGUTI, A; HO, P.; CRAMPTON, J. & THEAKSTON, R. “Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: expression in escherichia coli and inhibition of the platelet-collagen interaction.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* **369**, (2): 295-301, 1999
- MOURA-DA-SILVA, A.; RAMOS, O.; BALDO, C.; NILAND, S.; HANSEN, U.; VENTURA, J.; FURLAN, S.; BUTERA D.; DELLA-CASA, M.; TONJONI, I.; CLISSA, P.; FERNANDES I.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.

- & EBLE, J. "Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases." *Biochimie* **90**: 484-492, 2008.
- MUNIZ, J. R. ; AMBROSIO, A.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.; MOURA-DASILVA, A.; OLIVA, G.; GARRATT, R. & SOUZA, D. H.F. "Toxicon The three-dimensional structure of bothropasin , the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom : Insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups." *Toxicon* **52**: 807-816, 2008.
- NI, H. & FREEDMAN, J. "Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands." *Transfusion and Apheresis Science* **28** (3): 257-264, 2003.
- NICOLAU, J.C.; CESAR, L. A.; TIEMEMAN, A.; PIEGAS, L.S. & MARINETO, J. "Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST." *Sociedade Brasileira de Cardiologia* **89**, (4) 2007.
- NIEWIAROWSKI, S.; MC LAINE, M; KLOCZEWIAK, M. & STEWART, G. "Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors." *Seminars in Hematology* **3** (4): 289-300, 1994.
- NYKVIST, P.; TU, H.; IVASKA, J.; KAPYLA, J.; PIHLAJANIEMI, J. & HEINO, J. "Distinct Recognition of Collagen Subtypes by alpha1 beta 1 and alpha 2 beta 1." *Biochemistry* **275** (11): 8255-8261, 2000.
- PAINE, M.; DESMOND, H.; THEAKSTONS, R. & CRAMPTON, M. "Purification , Cloning , and Molecular Characterization of a High Molecular Weight Hemorrhagic Metalloprotease , Jararhagin , from *Bothrops jararaca* venom." *The Journal of Biological Chemistry* **267** (15): 22869-22876, 1992.
- PATTON, W.F. "Detection technologies in proteome analysis." *Journal of Chromatography B*, **771**: 3-31, 2002.
- PLOW, E.; HAAS, T.; ZHANG, L.; LOFTUS, J. & SMITH, J. "Ligand binding to integrins." *The Journal of Biological Chemistry* **275** (29): 21785-21788, 2000.
- QUEIROZ, L.; NETO, S.; ASSAKURA, M.; REICHL, P. & MANDELBAUM, F. "Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom." *Toxicon* **23** (2): 341-345, 1985.

- RAMOS, O. H. & SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. “Snake venom metalloproteases--structure and function of catalytic and disintegrin domains.” *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP* **142** (3-4): 328-346, 2006.
- RENART, J.; REISER, J. & STARK, G. R. “Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76** (7): 3116-20, 1979.
- RIBEIRO, J. U. *Efeitos das Desintegrinas Alternagina-C e Dis-Ba 01 de Bothrops Alternatus em Fibroblastos, Células Endoteliais e Tumoriais*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UFSCar, 2009. Tese de doutorado, 175p.
- SAJEVIC, T.; LEONARDI, A. & KRIZAJ, I. “Haemostatically active proteins in snake venoms.” *Toxicon*, February: 1-19, 2011.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. “DNA sequencing with chain terminating inhibitors”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463-5467, 1997.
- SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; PONTES, C. L.; MONTENEGRO, C. F. & MARTIN, A. C. “Snake Venom Disintegrins and Cell Migration.” *Toxins* **2**: 2606-2621, 2010.
- SILVA, C.; ZULIANI, J.; ASSAKURA, M.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C.; TEIXEIRA, C. & SERRANO, S. “Activation of aMb2-mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* **322**: 950-956, 2004.
- SILVA, T.; BUTERA, A. P.; HENRIQUES, D.; LEAL, S. & ALVES, R. “Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha v \beta$.” *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **43**: 1-17, 2007.
- SOUZA, D. H. F.; IEMMA, M. R. C.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J.; OLIVA, M.; ZINGALI, R.; NIEWIAROWSKI, S. & SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. “The Disintegrin-like Domain of the Snake Venom Metalloprotease Alternagin Inhibits $\alpha 2 \beta 1$ Integrin- Mediated Cell Adhesion.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* **384** (2): 341-350, 2000.

- TAKAGI, J.; PETRE, B.; WALZ, T. & SPRINGER, T. "Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling." *Cell* **110** (5): 599-611, 2002.
- TAKEDA, S.; IGARASHI, T.; MORI H. & ARAKI, S. "Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold." *EMBO Journal* **25** (11): 2388-2396, 2006.
- TANJONI, I.; EVANGELISTA, K.; DELLA-CASA, M.; BUTERA, D.; MAGALHÃES, G.; BALDO, C.; CLISSA, P.; FERNANDES, I.; EBLE, J. & MOURA-DA-SILVA, A. "Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to alpha2beta1 integrin and collagen." *Toxicon* **55** (6): 1093-1099, 2010.
- USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; SHIMA, H.; YOSHIDA, E.; YOSHIKA, A.; HIRAMA, K.; SUZUKI, M. & TITANI, K. "A 28KDa protein with disintegrin like structure jararagin-C inhibits collagen and ADP induced platelet aggregation.pdf." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201** (1): 331-339, 1994.
- WARRELL, D. A. "Snake bite." *The Lancet* **375**: 9708: 77-88, 2010.
- WOLPERT, L. *Principios de Biologia do Desenvolvimento*. Ed. Artes Médicas Sul, 2000, p. 10-15.
- XIONG, J.; STEHLE, T.; ZHANG, R.; JOACHIMIAK, A.; FRECH, M.; GOODMAN, S. & ARNAOUT, A. "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand." *Science* **296**(5565):151-5, 2002.
- ZHOU, Q.; SMITH, J. & GROSSMAN, M. "Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen." *The Biochemical Journal* **307**: 411-417, 1995.