

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DE SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

SARAH SOUSA SALVADOR

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE
UMA DESINTEGRINA RGD RECOMBINANTE
(DISBA-01) INIBIDORA DA INTEGRINA $\alpha v\beta 3$**

SÃO CARLOS - SP
2025

SARAH SOUSA SALVADOR

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UMA DESINTEGRINA RGD
RECOMBINANTE (DISBA-01) INIBIDORA DA INTEGRINA $\alpha v\beta 3$**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal de
São Carlos para obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa Dra. Heloísa
Sobreiro Selistre de Araujo

São Carlos - SP
2025

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, à minha família e aos meus amigos, que sempre me ofereceram apoio e estiveram ao meu lado em todos os momentos. Sou profundamente grata pelo amor e pelo carinho

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, a Deus por sempre estar presente em minha vida, me abençoando, cuidando e zelando por mim. Agradeço profundamente aos meus pais, Levi Moreno Salvador e Kerly Cristina Sousa Salvador, pelo amor e carinho, por sempre me apoiarem e incentivarem a buscar meus sonhos. À Rebecca Sousa Salvador, minha irmãzinha querida, que eu amo demais: sinto sua falta a cada dia que passa, mas sei que um dia nos encontraremos novamente.

Ao Gabriel Martins de Castro, hoje meu noivo e, em breve, meu marido, agradeço pelo amor e carinho, pelas risadas que tornaram o processo mais leve e pelo ombro amigo que fez dias e momentos difíceis mais serenos.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Professora Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo, pela oportunidade de participar de seu laboratório e realizar este trabalho, pela orientação atenta e por sempre tratar meus momentos de dúvidas com disponibilidade e atenção.

Aos amigos do LMBBM, obrigada pela atenção e por compartilharem o conhecimento e a experiência de cada um, obrigada pelas risadas e amizades. Em especial, agradeço ao Paulo, Raul, Ana Carolina, que me ensinaram muito e pela paciência durante todo o trabalho.

Agradeço à Camila Moraes pela amizade que se tornou tão especial em pouco tempo; obrigada pelos momentos em que compartilhamos nossa história, nossas conquistas e nossas dificuldades. Esse momento não teria sido o mesmo sem você. Obrigada, amiga querida! Também gostaria de agradecer ao Professor Gilmar Perbiche Neves, que me auxiliou em uma etapa anterior a este trabalho e com quem eu aprendi muito.

Aos amigos que conheci durante a graduação, meu sincero obrigada por cada risada, incentivo e ajuda que tornaram essa jornada incrível e memorável. Em particular a Ana Paula Horta, Vitória Diotto, Júlia Pasqual, Daniel Cometta, Victor Gerke, William Rossani, Pietra Terruggi, Victoria Braga, entre tantos outros que participaram dessa caminhada. Gostaria de deixar um agradecimento especial à Ana Paula e ao Gustavo Léo Barros, que, sempre que possível, foram além das responsabilidades acadêmicas e contribuíram de forma significativa para esta jornada.

Aos amigos da igreja que me ouviram inúmeras vezes a respeito da graduação, obrigada pelo apoio, pelo incentivo, e, principalmente pelo carinho e paciência durante essa etapa. Em especial, Gabrielly Arcilla, Isabelly Arcilla, Rute Bertoldi, Fernando Bertoldi e Gabrieli Silva.

Por fim, posso ter esquecido de citar alguém, mas saibam que são igualmente importantes. São tantas pessoas que seria impossível citar todas aqui. Amo todos vocês.

RESUMO

A expressão heteróloga de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* geralmente ocorre em condições desnaturantes, o que pode impedir o dobramento natural da proteína e favorecer a formação de corpos de inclusão, exigindo o uso de agentes como a ureia durante a purificação. No entanto, esse processo acaba levando à necessidade de remover a ureia ao final, o que pode resultar em uma perda na recuperação da atividade biológica da proteína de interesse. Diante disso, este trabalho buscou otimizar a produção da proteína recombinante DisBa-01, que pertence à classe das desintegrinas e apresenta alta afinidade pela integrina $\alpha\beta3$ devido ao seu domínio RGD, utilizando condições não desnaturantes. Com essa abordagem, a ideia consistiu em adaptar etapas de expressão e purificação para manter a proteína em sua forma nativa, buscando estratégias na redução da temperatura e aumento na expressão do tempo de cultivo microbiano, evitando o uso de elevadas quantidades de ureia e, assim, reduzindo perdas ao longo do processo e diminuindo o custo da sua produção. Os resultados obtidos mostraram-se promissores, pois houve a obtenção da proteína recombinante DisBa-01 na forma solúvel, bem como, sua atividade biológica foi significativa, confirmado por ensaios *in vitro*. De forma geral, o estudo apresenta uma alternativa para a produção da DisBa-01 de maneira mais eficiente, visando favorecer futuras análises funcionais desta desintegrina.

Palavras chaves: produção recombinante, expressão heteróloga, condições não desnaturantes, desintegrina DisBa-01, integrina $\alpha\beta3$.

ABSTRACT

Heterologous expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* generally occurs under denaturing conditions, which can prevent natural protein folding and favor the formation of inclusion bodies, requiring the use of agents such as urea during purification. However, this process ultimately leads to the need to remove the urea at the end, which can result in a loss in the recovery of the biological activity of the protein of interest. Therefore, this work aimed to optimize the production of the recombinant protein DisBa-01, which belongs to the class of disintegrins and exhibits high affinity for the $\alpha\beta 3$ integrin due to its RGD domain, using non-denaturing conditions. With this approach, the idea was to adapt expression and purification steps to maintain the protein in its native form, seeking strategies to reduce the temperature and increase the expression time of microbial culture, avoiding the use of high amounts of urea and thus reducing losses throughout the process and decreasing the cost of its production. The results obtained were promising, as the recombinant protein DisBa-01 was obtained in soluble form, and its biological activity was significant, confirmed by *in vitro* assays. Overall, the study presents an alternative for the more efficient production of DisBa-01, aiming to facilitate future functional analyses of this disintegrin.

Key-word: recombinant production, heterologous expression, non-denaturing conditions, DisBa-01 disintegrin, $\alpha\beta 3$ integrin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1. Família das Integrinas.....	9
Figura 2. Sinalização bidirecional e conformação das Integrinas.....	10
Figura 3. Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas do plasmídeo pDisBa-01.....	12
Figura 4. Mapa do vetor pET-28a(+)......	13
Figura 5. Confirmação da expressão da proteína DisBa-01 em E.coli BL21(DE3) em pET-28a.....	20
Figura 6. Análise em gel SDS-PAGE15% da purificação da DisBa-01.....	21
Figura 7. Western Blotting da DisBa-01.....	21
Figura 8. Esferóides de HUVEC submetidos ao ensaio de ativação das caspases por fluorescência.....	25
Figura 9. Esferóides de MDA-MB-231 avaliados pelo ensaio de viabilidade Live/Dead por fluorescência.....	26

Gráficos

Gráfico 1. Ensaio Transwell com DisBa-01.....	23
--	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 INTEGRINAS.....	9
1.2 DESINTEGRINA DisBa-01.....	11
1.3 ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 CRESCIMENTO BACTERIANO E EXPRESSÃO DA DisBa.....	15
3.2 LISE CELULAR E EXPRESSÃO DA DISBA.....	16
3.3 PURIFICAÇÃO POR COLUNA DE AFINIDADE À NÍQUEL E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA.....	16
3.4 WESTERN BLOTTING.....	17
3.5 TESTE DE ATIVIDADE DA DISBA-01.....	18
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	19
4.1 OBTENÇÃO DE DISBA-01 PURIFICADA.....	19
4.2 ANÁLISE DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO TRANSWELL COM CÉLULAS 4T1.....	22
4.3 INTERAÇÃO ENTRE LINHAGENS CELULARES E A PROTEÍNA RECOMBINANTE DISBA.....	24
5. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIA	28

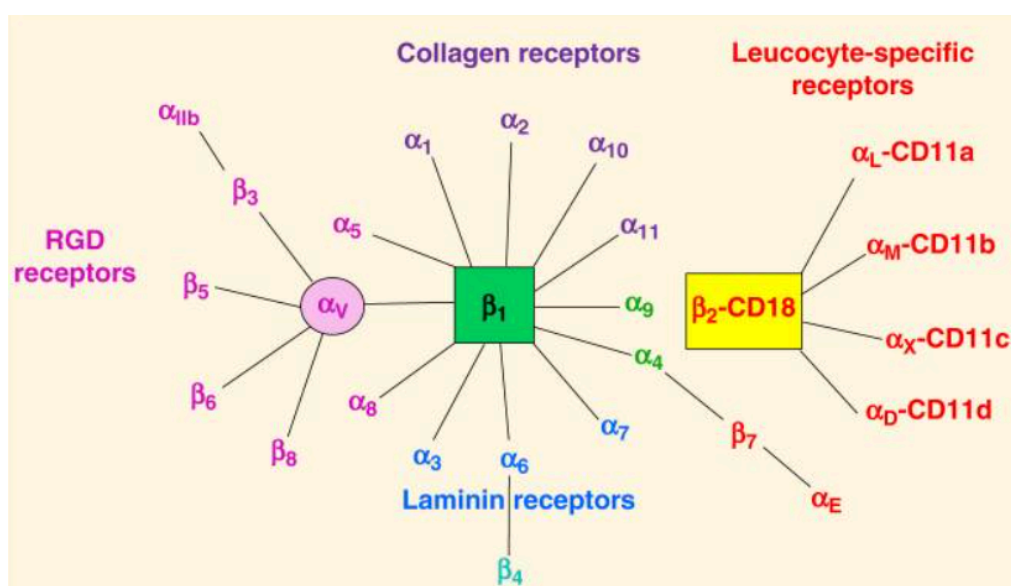
1. INTRODUÇÃO

1.1 INTEGRINAS

As integrinas pertencem à uma grande família de proteínas transmembranas responsáveis pela comunicação entre a matriz extracelular (MEC) e o citoesqueleto celular. Devido dessa comunicação, elas desempenham diversas funções essenciais: sinalização, crescimento e proliferação celular, bem como migração e liberação de citocinas (Mezu-Ndubuisi et al., 2021).

A integrinas são proteínas heterodiméricas constituídas por duas subunidades denominadas alfa (α) e beta (β) que interagem entre si por ligações não covalentes, resultando em diversas combinações entre as diferentes subunidades $\alpha\beta$. Atualmente, é conhecida a existência de 24 pares de subunidades em mamíferos, formados por uma das 18 subunidades da cadeia α e 8 da β . Além disso, como exemplificado na figura 1, as integrinas são classificadas segundo o seu ligante e divididas em 4 grupos: (I) integrinas que ligam colágeno, (II) integrinas que se ligam à laminina, (III) integrinas que reconhecem o motivo RGD (Arginina, Glicina, Ácido Aspártico) e (IV) integrinas de leucócitos (Mezu-Ndubuisi et al., 2021).

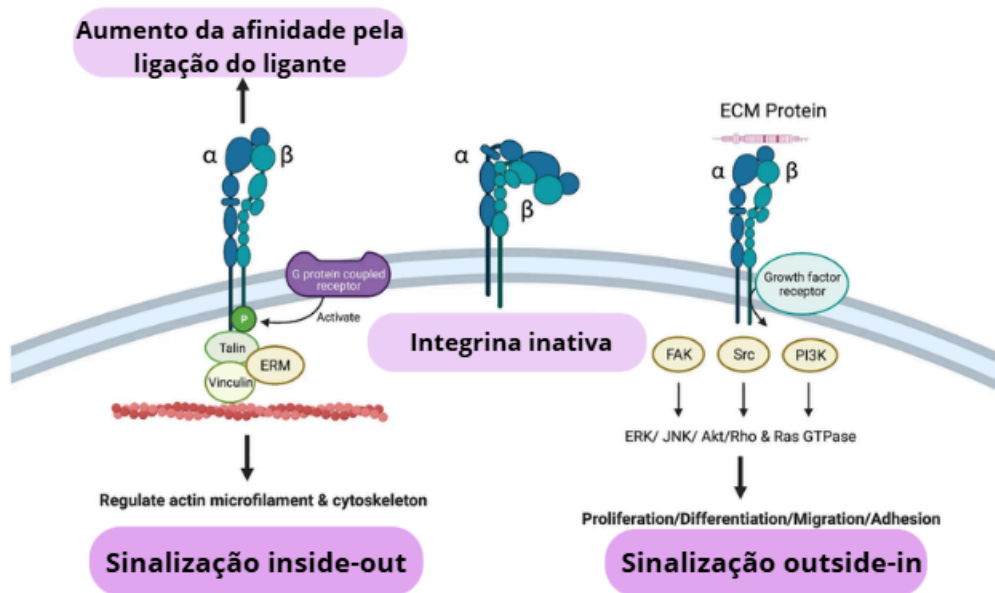
Figura 1. Família das Integrinas



Fonte: Mezu-Ndubuisi et al., 2021.

As integrinas, ao reconhecerem e se vincularem a componentes da matriz extracelular, promovem a conversão de estímulos mecânicos em sinais bioquímicos. Esses sinais são transmitidos ao domínio citoplasmático, onde modulam interações com proteínas do citoesqueleto, indicando que tais receptores desempenham um papel essencial na transdução bidirecional de sinais através da membrana plasmática (Kadry et al., 2020). As integrinas não são constitutivamente ativas; sua ativação ocorre mediante a modulação complexa de uma cascata de reações citoplasmáticas que induzem mudanças conformacionais, passando de um estado inativo dobrado para a conformação estendida ativa (Figura 2). A modulação é coordenada por proteínas citoplasmáticas, como talina, kindlin e paxilina, que aumentam a densidade de integrinas e, conseqüentemente, amplificam a sinalização inside-out, levando a formação de complexos de adesão focal, incluindo a ativação de quinases intracelulares, como quinase de adesão focal (FAK), o protooncogene tirosina quinase (Src), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Além disso, a interação entre integrinas e os fatores de crescimento (GFRs) é responsável por assegurar o processo natural do desenvolvimento (Li et al., 2023).

Figura 2. Sinalização bidirecional e conformação das Integrinas



Fonte: Adaptado de (Dhaliwal; Shepherd, 2012).

Conforme mencionado, as integrinas constituem uma classe essencial de proteínas envolvidas na interação entre a célula e a matriz extracelular, exigindo controle regulatório altamente preciso. Sendo assim, alterações nesses mecanismos podem resultar em desregulações significativas, contribuindo para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o câncer (Li et al., 2023).

O foco principal deste trabalho foi a integrina $\alpha v\beta 3$, receptor de vitronectina que reconhece proteínas contendo o motivo RGD e participa da interação com o receptor do fator de crescimento endotelial vascular-2 (VEGFR-2). A fosforilação do VEGFR-2, modulada pela integrina $\alpha v\beta 3$, a qual contribui para o recrutamento de células da medula óssea em regiões de angiogênese. Em células endoteliais de veia umbilical humana, o VEGFR-2 também regula a migração e a adesão celular por meio da ativação da integrina $\alpha v\beta 3$ (Li et al., 2023; Koch S et al., 2012 ; Casali BC et al., 2022).

1.2 DESINTEGRINA DisBa-01

As desintegrinas são proteínas pequenas presentes no veneno de serpentes. O grupo do nosso laboratório, Laboratório Multiusuário de Bioquímica e Biologia Molecular (LMBBM) do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, estuda a desintegrina originária do veneno de *Bothrops alternatus*, denominada DisBa-01, a qual inibe a integrina $\alpha v\beta 3$ (Ramos et al., 2008). Além disso, a proteína DisBa-01 contém o motivo RGD, o que lhe confere elevada afinidade pela integrina $\alpha v\beta 3$ (Montenegro et al., 2017). Portanto, considerando a forte interação entre a integrina $\alpha v\beta 3$ e a DisBa-01, foi possível confirmar, mediante experimentos *in vitro*, a capacidade dessa desintegrina de inibir de migração de determinadas linhagens celulares (Casali BC et al., 2022).

Figura 3. Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas do plasmídeo pDisBa-01.

		pET28a peptídeo de fusão																													
1	ATG	GGC	AGC	AGC	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAC	AGC	AGC	GGC	CTG	GTG	CCG	CGC	GGC	AGC	CAT	ATG	GCT	AGC	ATG	ACT	GGT	GGA	CAG	CAA	ATG	90
1	M	G	S	S	H	H	H	H	H	H	S	S	G	L	V	P	R	G	S	H	M	A	S	M	T	G	G	Q	Q	M	30
		DisBa-01																													
91	GGT	CGC	GGA	TCC	GGA	AAT	GAA	CTT	TTG	GAG	GCG	GGA	GAA	GAA	TGT	GAC	TGT	GGC	ACT	CCT	GGA	AAT	CCG	TGC	TGC	GAT	GCT	GCA	ACC	TGT	180
31	G	R	G	S	G	N	E	L	L	E	A	G	E	E	C	D	C	G	T	P	G	N	P	C	C	D	A	A	T	C	60
181	AAA	CTG	AGA	CCA	GGG	GCG	CAG	TGT	GCA	GAA	GGA	CTG	TGT	TGT	GAC	CAG	TGC	AGA	TTT	ATG	AAA	GAA	GGA	ACA	GTA	TGC	CGG	ATT	GCA	AGG	270
61	K	L	R	P	G	A	Q	C	A	E	G	L	C	C	D	Q	C	R	F	M	K	E	G	T	V	C	R	I	A	R	90
271	GGT	GAT	GAC	ATG	GAT	GAT	TAC	TGC	AAT	GGC	ATA	TCT	GCT	GGC	TGT	CCC	AGA	AAT	CCC	TTC	CAT	GCC	TAA	339							
91	G	D	D	M	D	D	Y	C	N	G	I	S	A	G	C	P	R	N	P	F	H	A	▲	105							

O peptídeo de fusão proveniente do vetor pET28a está indicado em fundo cinza. O motivo **RGD** encontra-se destacado em cinza, e o códon de parada é representado pelo símbolo “▲”. Fonte: adaptado de Ramos et al., 2008.

Os estudos mostram que a DisBa-01 atua como um modulador multifuncional no microambiente tumoral, desempenhando diferentes efeitos sobre células endoteliais, fibroblastos e células tumorais. Isso demonstra que a inibição desse receptor impede a ativação da Metaloproteinase da Matriz 2 (MMP-2) na superfície celular, comprometendo a migração e faz com que células com bloqueio da integrina percam a direcionalidade do movimento, devido à formação de adesões mais estáveis (Montenegro et al., 2012). As células tratadas com DisBa-01 apresentaram morte celular associada à ativação de vias autofágicas, retardando a morte apoptótica imediata, e, conseqüentemente, aumentando o tempo de vida celular (Lino et al., 2019).

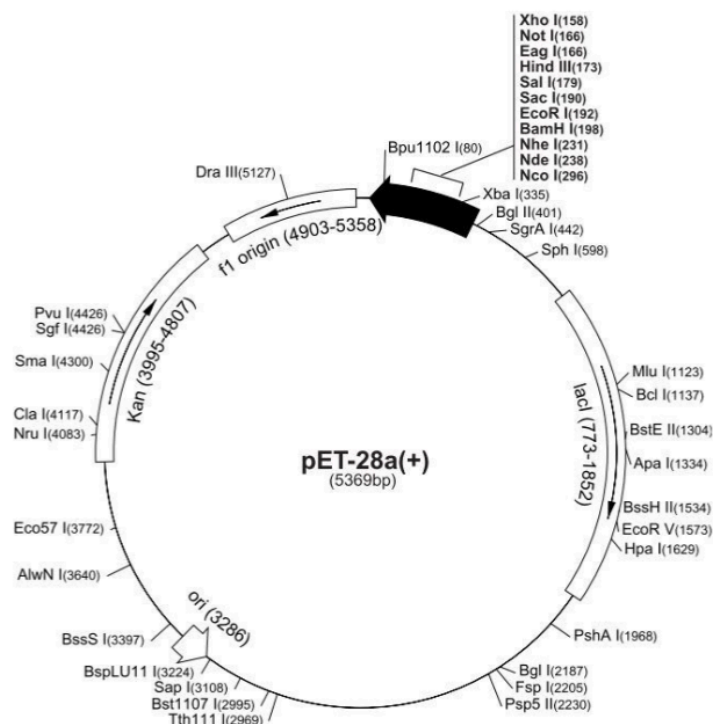
A construção do plasmídeo utilizado para a expressão da proteína recombinante DisBa teve início a partir de uma biblioteca de cDNA extraída da glândula de veneno da serpente *Bothrops alternatus*. O produto de PCR obtido foi então clonado e inserido no vetor pET-28a (Novagen - Madison) (Figura 4). Esse plasmídeo possui um promotor T7, reconhecido pela RNA polimerase T7, e apresenta uma região MCS (Multiple Cloning Site), onde o gene de interesse foi inserido no sítio múltiplo de clonagem entre os sítios *Bam* HI e *Eco* RI. Além disso, o vetor contém uma cauda de histidina (His-Tag) fundida na região N-terminal, um gene de resistência à canamicina (Kan), utilizado para a seleção das bactérias transformadas, e uma origem de replicação (Ori), essencial para garantir a replicação do plasmídeo em *E.coli*, permitindo sua manutenção nas células após a

transformação. Para a produção da proteína recombinante, o plasmídio foi inserido na linhagem de *E. coli* BL21(DE3), resultando em cepas transformadas (Ramos et al., 2008).

A linhagem *E. coli* BL21(DE3) possui no cromossomo uma cópia do gene que codifica a T7 RNA polimerase, proveniente do bacteriófago λ DE3. Esse gene está sob controle do promotor lacUV5, que permite regular sua expressão. Assim, somente após a indução com IPTG (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) ocorre a síntese da T7 RNA polimerase. Essa enzima é capaz de reconhecer o promotor T7 presente no plasmídeo de expressão e, dessa forma, o gene clonado no plasmídeo é fortemente transcrito, produzindo grande quantidade de mRNA. Consequentemente, os ribossomos da *E. coli* BL21(DE3) traduzem esse mRNA, resultando na produção da proteína recombinante de interesse.

As cepas transformadas foram armazenadas a -80°C em glicerol (substância crioprotetora), garantindo sua viabilidade para posteriores etapas de expressão.

Figura 4. Mapa do vetor pET-28a(+)



Fonte: Novagen TB074, 12/98.

1.3 ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A expressão de proteína recombinantes em *Escherichia coli* geralmente formam proteínas desnaturadas que não foram corretamente enoveladas, conseqüentemente formam agregação da proteína-alvo, formando partículas insolúveis chamadas de corpos de inclusão. Esses corpos de inclusão geralmente são produzidos devido ao alto rendimento e à velocidade de expressão, pois não há tempo nem condições adequadas para a proteína de dobrar corretamente (Hashemzadeh et al., 2021). Quando isso acontece, a ureia acaba sendo muito utilizada, pois é capaz de solubilizar esses agregados quando em concentrações altas (6-8M). O uso da ureia permite solubilizar as proteínas agregadas, rompendo as interações não covalentes que mantêm os agregados unidos (Singh et al., 2015). Portanto, a proteína fica completamente desnaturada, podendo ser purificada, pois a cauda de His permanece acessível para a coluna de afinidade.

Apesar de facilitar a solubilização, o uso da ureia traz um problema importante: depois da purificação, ela precisa ser totalmente removida, esse reprocessamento das proteínas de corpos de inclusão em forma nativa é complexo (refolding), precisando de processos como diluição gradual e diálise, podendo gerar perdas significativas, porque a proteína pode reagregar ou precipitar durante a retirada do agente desnaturante (Hashemzadeh et al., 2021). Assim, mesmo que o rendimento inicial pareça alto, o rendimento final de proteína funcional costuma ser bem menor.

Os corpos de inclusão não são totalmente amorfos e podem conter regiões parcialmente dobradas. Por isso, têm sido testados alternativas de solubilização mais suaves, como uso de concentrações menores de uréia, pH alcalino ou detergentes leves, visando preservar ao máximo estruturas nativas e melhorar o rendimento depois do redobramento (refolding) (Upadhyay et al. 2015). Dessa forma, protocolos que evitam a desnaturação completa têm se mostrado vantajosos para recuperar proteínas com maior chances de estarem funcionais (Singh et al., 2015).

Considerando esse cenário, trabalhar diretamente com condições não desnaturantes - como foi proposto para a produção da DisBa-01 - tornou-se uma estratégia relevante. O protocolo descrito por Ramos et al. (2008), foram empregadas técnicas de recuperação da proteína DisBa-01 por meio de etapas de

diálise. Neste trabalho, buscou-se a obtenção da proteína recombinante DisBa-01 em sua forma solúvel, com o objetivo de minimizar a necessidade de processos de refolding e, conseqüentemente, evitar a perda de sua atividade biológica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer uma nova metodologia para purificação da proteína recombinante DisBa-01 em condições não desnaturantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a expressão da proteína sob diferentes condições de temperatura e tempo de cultivo microbiano que favoreçam sua solubilidade.
- Desenvolver uma metodologia de purificação da proteína em condições não desnaturantes e avaliar a funcionalidade da desintegrina em células tumorais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CRESCIMENTO BACTERIANO E EXPRESSÃO DA DisBa-01

O crescimento bacteriano de *Escherichia coli* BL21(DE3) foi efetuado em duas etapas. Na primeira etapa, foi preparado um pré-inóculo em um Falcon de 50 mL contendo 25mL de meio de cultivo Líquido Broth (LB), 25 µL do antibiótico canamicina (30 mg/mL) e o inóculo proveniente do estoque armazenado a -80°C. O pré-inóculo foi colocado a meia rosca no shaker a 250 rpm, 37°C, por 18h. Concomitantemente, foram autoclavados dois Erlenmeyers contendo, cada um, 500 mL de LB.

Na segunda etapa, após as 18h, em cada Erlenmeyer foram adicionados 5 mL do pré-inóculo e 500 µL de canamicina (30 mg/mL), então foram colocados no shaker a 250 rpm, 37°C, por 2h. Ao término do período de incubação, a absorbância dos meios de cultivo foi determinada em espectrofotômetro no

comprimento de onda de 660 nm. As amostras de cada Erlenmeyer apresentaram densidade óptica (DO) entre 0,4 e 0,6, conforme esperado. A análise da absorbância teve como finalidade confirmar que a cultura bacteriana se encontrava na fase log (exponencial) de crescimento.

Após atingir a absorbância esperada, foram coletadas alíquotas de 50 µL da cultura de cada frasco Erlenmeyer, em condições assépticas, correspondentes ao tempo inicial (T0). Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de IPTG *Isopropil-β-D-1--tiogalactopiranosídeo* (100 mM, concentração 1%) a cada frasco, que foram reincubados no shaker a 250 RPu, 20°C, overnight. Ao final do período de incubação, coletaram-se novamente alíquotas de 50 µL de cada frasco, em condições assépticas, correspondentes ao tempo T24.

3.2 LISE CELULAR E EXPRESSÃO DA DISBA-01

As culturas de cada frasco Erlenmeyer foram centrifugadas em centrífuga Sorvall por 7 minutos a 5.000 rpm (Sorvall RC5C Plus, rotor GSA). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspensionado em 100 mL de Binding buffer (Imidazol 5 mM, NaCl 0,5 M e Tris 40 mM, pH 7.9).

A ressuspensão foi transferida para falcons estéreis para a sonicação; o processo ocorreu em uma sequência de 8 pulsos de amperagem, intercalados por 30 segundos de descanso por amostra no gelo. A sonicação teve como objetivo promover a lise da parede e da membrana celular bacteriana, permitindo a liberação do conteúdo citoplasmático.

O material sonicado foi novamente centrifugado em centrífuga Sorvall por 15 minutos, 1.300 rpm, a 4°C (Sorvall RC5C Plus, rotor SS-34). Finalizada a centrifugação, coletou-se uma alíquota de 50µL do sobrenadante (S1), que foi então armazenada em Falcon mantido a 4°C.

Ao final da lise celular, a presença da DisBa nas alíquotas foi avaliada por meio de SDS-PAGE a 15%.

3.3 PURIFICAÇÃO POR COLUNA DE AFINIDADE À NÍQUEL E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA

Após o período de expressão da proteína, o conteúdo foi submetido a purificação sob condições não desnaturantes por meio de cromatografia de afinidade em resina de Níquel, HIS-Select™ Nickel Affinity Gel (Sigma Aldrich), foi utilizada uma coluna cromatográfica contendo 2 mL de resina. A proteína DisBa-01 contém seis resíduos do aminoácido histidina, (*His-Tag sequence*) inseridos na região N-terminal. A sequência Hist-Tag se liga ao cátions divalentes (Ni^{2+}) imobilizados na resina de quelação metálica Hist-Bind. Após a remoção das proteínas-não-ligadas por lavagem pelo Washing Buffer (Imidazol 40 mM, NaCl 4 M e Tris 160 mM, pH 7.4), a proteína alvo foi recuperada por eluição pelo Elute Buffer (Imidazol 250 mM, NaCl 0,5 M e Tris-HCl 40 mM, pH 7.9) mediante à competição da proteína-alvo com o Imidazol.

Durante a purificação na coluna de níquel, as frações eluídas foram coletadas em tubos de ensaios e armazenadas, retirando-se uma alíquota de 10 μL de cada fração. Essas alíquotas foram posteriormente analisadas por SDS-PAGE a 15% para identificar quais frações provenientes da purificação contêm a proteína DisBa-01.

Após a purificação, as amostras contendo as bandas mais intensas da DisBa-01 (frações E₁₃, E₁₄, E₂₃ e E₂₄) foram unidas e submetidas à purificação em uma centrífuga refrigerada. Para essa etapa, utilizou-se o Kit Centricon - com uma membrana com 3 KDa. A concentração foi realizada por meio de ciclos sucessivos de centrifugação (30 minutos, 7500 rpm, 4°C). No ciclo final, adicionou-se tampão (Tris 10mM) até que o volume final atingisse 1 mL.

Em seguida, a amostra foi submetida à etapa de concentração por filtração utilizando unidades de ultrafiltração Centrifugal Filter Units - 30K (Amicon Ultra-4, REF: 803096). O filtro, contendo membrana com poros de 30 KDa, foi acoplado a um tubo Falcon de 50 mL e centrifugado a 7.500 rpm por 30 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, as proteínas permaneceram retidas no filtro e a proteína de interesse passou pela membrana, uma vez que a DisBa-01 apresenta massa molecular aproximada de 12 KDa. A concentração final da proteína foi determinada pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA), utilizado o Kit BCA Protein Assay Kit (Pierce BCA Protein Assay, REF: 232225).

3.4 WESTERN BLOTTING

Após a concentração por filtração, foi realizado o Western Blotting da DisBa-01 para confirmar a presença da proteína por meio da detecção da cauda de histidina (His-Tag). Inicialmente, a amostra foi aplicada em gel SDS-PAGE 15% e feita a corrida de eletroforese. Após a corrida, foi realizada a transferência do gel à membrana de nitrocelulose por 2 horas utilizando o tampão de transferência (Tris 2,5 mM, Glicina 19,2 mM, SDS 0,069 mM, 20% metanol). A fim de verificar se a etapa anterior funcionou, a membrana foi corada com Ponceau (0,1g de Ponceau em 50mL de água MiliQ + 500µL de ácido acético) por 5 minutos sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada com água Mili-Q para retirar o corante. Posteriormente, a membrana foi posta em uma solução de bloqueio por 2 horas sob agitação, solução preparada com leite em pó desnatado (5%).

Finalizado o bloqueio, a membrana foi lavada com TBST (100mL da solução Tris Base 24,2g e 80g NaCl, 900mL de água MiliQ e 500µL de Tween 20) 3 vezes por 5 minutos sob agitação, descartando o tampão a cada lavagem. Logo depois, foi submetida ao anticorpo primário de Anti-Poli-Histidina monoclonal (Sigma, A5588-5ML, REF: 085k4768) por 1,5 hora, permitindo a interação específica entre o anticorpo e a cauda de histidina presente na DisBa-01. Findado o processo, a membrana foi novamente lavada com TBST semelhante à etapa anterior. Preparou-se o reagente revelador, pastilha (BCIP/NBT tablets) diluída em 10mL de água Milli-Q, a qual foi aplicado diretamente sobre a membrana para a revelação da banda correspondente à proteína de interesse.

3.5 TESTE DE ATIVIDADE DA DISBA-01

A fim de testar a atividade biológica da proteína purificada foi adotado o ensaio de migração celular Transwell utilizando células de camundongos da linhagem 4T1, considerando um período de migração de 24 horas. Para o ensaio, empregou-se uma placa de 24 poços (K12-024, KASVI) e 6 insertos Transwell com poros de 8 µm (Corning Transwell Inserts Costar, Costar).

As células (1×10^4) foram ressuspensas em meio de cultivo (RPMI 1640) sem soro fetal bovino (SFB), e, em seguida, incubadas com DisBa-01 nas concentrações 1 nM, 10 nM, 100 nM e 1000 nM, totalizando um volume final de 250 µL em cada Eppendorf. Os controles negativo e positivo não tiveram tratamento, ou seja, as células foram ressuspensas em meio de cultivo em 250 µL. Os conteúdos foram

aplicados nos insertos previamente posicionados sobre poços contendo meio de cultivo suplementado com SFB (químioatraente) (750 μ L), exceto o controle negativo, utilizado para determinar a taxa basal de migração celular. Após o plaqueamento, a placa esteve incubada por 24 horas a 37°C e 5% CO₂.

Após o processo de migração, as células presentes na superfície inferior dos insertos foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% (pH 7) por 10 minutos. Concluída a fixação, os insertos foram submetidos a três lavagens sucessivas por imersão em PBS. Em seguida, realizou-se a marcação nuclear com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (0,7 ng/ μ L em 10mL de PBS) durante 20 minutos. Após a etapa de fluorescência, novas lavagens com PBS foram feitas para remover o excesso de corante, e as membranas localizadas na região inferior dos insertos foram cuidadosamente destacadas para a montagem das lâminas. A quantificação das células migradas foi feita através da análise *multiwavelength cell scoring*, e as imagens foram obtidas utilizando o microscópio ImageXpress Micro.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos dos ensaios de migração celular Transwell foram realizados em duplicata com dois ensaios independentes.

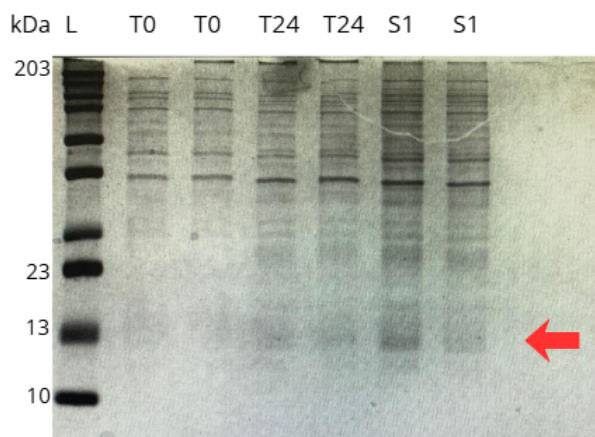
Os dados foram testados para normalidade e ANOVA de Welch ($p = 0,694$) e apresentados com média (\pm) e desvio padrão. Os testes aplicados e a geração dos gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0.1).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DE DISBA-01 PURIFICADA

Os procedimentos para a confirmação da obtenção da DisBa-01 foram conduzidos por meio do gel SDS-PAGE 15%, no qual foi possível observar a banda de aproximadamente 12 kDa, tornando-se mais evidente após a lise celular (amostras S1₁ e S1₂ da figura 5).

Figura 5. Confirmação da expressão da proteína DisBa-01 em *E.coli* BL21(DE3) em *pET-28a*.

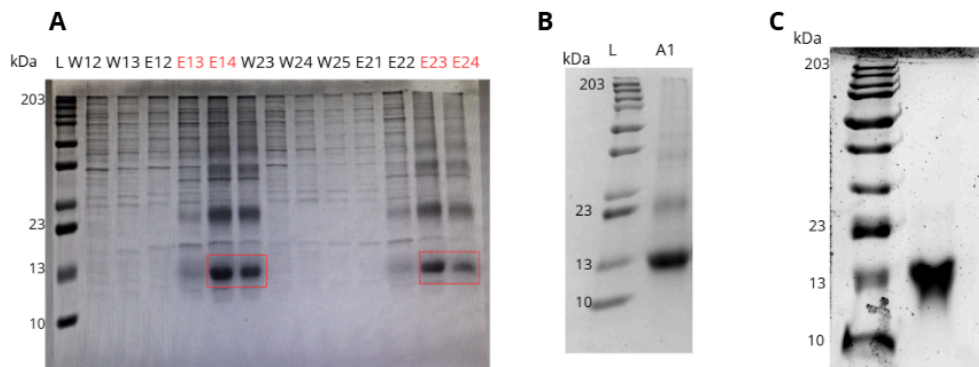


Fonte: autora

Após a confirmação da expressão da banda da proteína DisBa-01 em *E. coli* BL21(DE3), os processos subsequentes da coluna de níquel (Figura 6.A) e as etapas de concentração (Figura 6.B e C) permitiram a obtenção da proteína recombinante purificada sem a presença de contaminantes, mediante a verificação por meio de géis SDS-PAGE 15%.

Sendo que, na etapa da coluna de níquel, as amostras que apresentaram maior intensidade referentes à proteína recombinante (E_{13} , E_{14} , E_{23} e E_{24}) foram coletadas e concentradas por meio do Kit Centricon. Posteriormente a primeira concentração, a amostra foi novamente concentrada por filtração utilizando unidade de Filter Units - 30K, como o processo de concentração ocorreu por filtração, houve a remoção de contaminantes, permanecendo apenas uma banda de aproximadamente 12kDa (Figura 6.C).

Figura 6. Análise em gel SDS-PAGE15% da purificação da DisBa-01



(A) Alíquotas obtidas através das etapas de purificação na coluna de níquel. (B) As alíquotas após o buffer de eluição E₁₃, E₁₄, E₂₃, E₂₄ concentradas pelo Kit Centricon. (C) Amostras concentradas por filtração utilizando unidades de ultrafiltração Centrifugal Filter Units - 30K. Fonte: autora.

O ensaio de Western Blotting possibilitou a visualização, ainda que fraca, da banda correspondente à DisBa-01 na membrana de nitrocelulose. (Figura 7.) A banda fraca pode estar relacionada à elevada diluição utilizada para o anticorpo (1:1000, 10 μ L do anticorpo Anti-Poli-Histidina monoclonal em 10 mL de PBS com 1g de BSA). Além disso, as marcações inespecíficas observadas podem estar associadas a condições de bloqueio ou lavagem, e não diretamente à diluição do anticorpo.

Figura 7. Western Blotting da DisBa-01



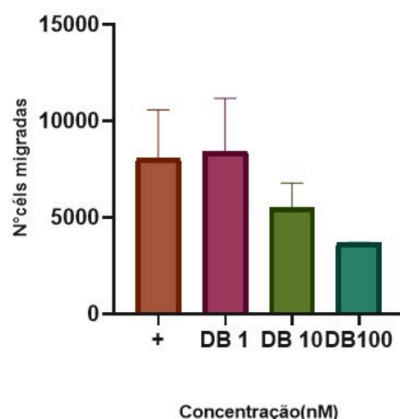
Membrana de nitrocelulose utilizada no ensaio de western blot, mostrando as bandas reconhecidas pelo anticorpo monoclonal anti-poli-histidina. Fonte: autora.

Uma das principais diferenças entre o protocolo empregado neste trabalho e o descrito por Ramos et al., 2008 foi a obtenção da proteína sob condições não desnaturantes. A estratégia de reduzir a temperatura de expressão de 37°C para 20°C e aumentar o tempo de indução com IPTG para overnight é descrita como uma abordagem eficaz para aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes em *E. coli*, reduzindo a formação de corpos de inclusão (Sørensen & Mortensen, 2005). Esses trabalhos demonstram que temperaturas mais baixas diminuem a taxa de tradução e favorecem o dobramento correto da proteína, o que explica a produção da DisBa-01 em sua forma solúvel, sem a necessidade do uso de ureia durante a purificação. De modo geral, a necessidade de agentes desnaturantes, como a ureia, está associada à expressão em altas temperaturas, que favorecem a formação de corpos de inclusão. Assim, conforme a literatura, protocolos que utilizam expressão em baixa temperatura tendem a produzir proteínas solúveis, dispensando etapas de renaturação (Galloway et al., 2003; Singh et al., 2015).

4.2 ANÁLISE DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO TRANSWELL COM CÉLULAS 4T1

O objetivo do ensaio de migração foi verificar se a DisBa-01 obtida neste protocolo manteve a atividade descrita por Ramos et al., 2008. As desintegrinas interferem na migração celular, pois são capazes de inibir as integrinas, as quais são ligadas a matriz extracelular, no caso, da DisBa-01 sua função é principalmente na integrina $\alpha\beta3$ (Montenegro et al., 2017). Por isso, era esperado uma redução no número de células que migraram conforme a concentração da proteína aumentasse.

Gráfico 1. Ensaio de inibição da migração transwell por DisBa-01



(+) Controle Positivo com 10% de SFB. (DB1), (DB10) e (DB100) DisBa-01 em concentrações de 1nM, 10nM e 100nM respectivamente. Fonte: autora.

Embora, nas concentrações mais elevadas (DB10 e DB100), tenha sido observada uma redução na migração das células da linhagem 4T1. Na concentração de 1 nM, o número de células migrantes acabou sendo maior que o controle positivo, o que não era o esperado. Uma possível justificativa é que concentrações baixas com a proteína podem ter sido responsáveis pelo efeito contrário ao previsto, em vez de inibir o efeito, acabaram estimulando a atividade, resultando em uma relação dose-resposta inversa ao esperado, processo denominado de hormese (Greenwood et al., 2022). Outro argumento que pode ser considerado é que a célula pode ter reprogramada a sinalização, ativando vias alternativas não-genômicas para compensar esse bloqueio inicial. Esse mecanismo de sinalização compensatório é comumente observado em células cancerígenas. Diante disso, atualmente há muitos estudos que buscam desenvolver alvos terapêuticos capazes de lidar com a complexidade da sinalização celular no câncer (O'Reilly et al., 2006; Bergholz & Zhao., 2021).

Em relação à análise estatística, o teste ANOVA de Welch resultou em $p = 0,694$, estatisticamente demonstrando que não foi observada diferença significativa entre os grupos. Devido ao p consideravelmente muito maior que 5% (0,05), é difícil sugerir uma tendência estatística, mas é possível observar que as médias dos tratamentos apresentaram padrão descritivo semelhante ao comportamento esperado da DisBa-01 em concentrações mais altas.

O conjunto do resultado desse experimento demonstra a importância de realizar novos ensaios de Transwell, aumentando o número de repetições para diminuir o desvio padrão das variáveis, e assim, aumentar o poder estatístico, permitindo compreender de forma mais precisa o comportamento da DisBa-01 obtida por este protocolo.

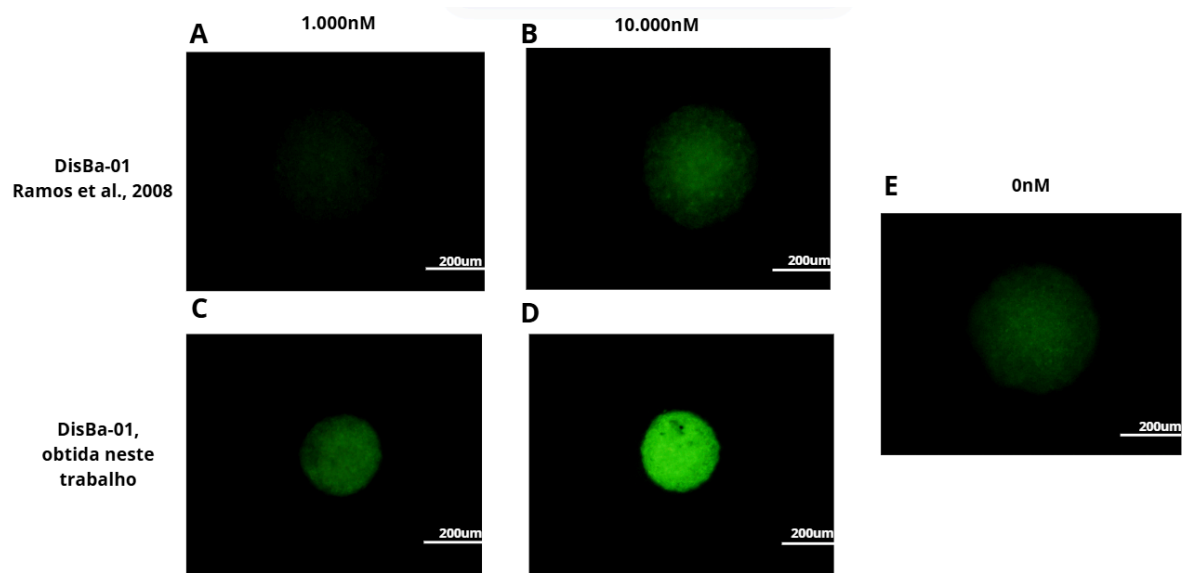
4.3 INTERAÇÃO ENTRE LINHAGENS CELULARES E A PROTEÍNA RECOMBINANTE DISBA

No Hospital de Amor contra o câncer em Barretos (SP), com o Grupo de Pesquisa em Oncologia Pré-Clínica, em colaboração com o nosso laboratório (LMBBM), foi realizado um experimento pelos pesquisadores Raul Wohnrath Garcia e Amanda Helena Tejada sendo que um dos objetivos foi avaliar a interação entre linhagens celulares com tanto a proteína recombinante DisBa-01 obtida por extração com ureia, conforme o protocolo descrito por Ramos et al., 2008, quanto da proteína recombinante produzida neste trabalho, purificada, portanto, sem o uso de ureia. Essas análises foram feitas em esferóides das linhagens celulares HUVEC e MDA-MB-231, testando diferentes concentrações de ambas as proteínas. A avaliação consistiu na captação de fluorescência para analisar se as células apresentavam indícios de apoptose e para analisar sua viabilidade.

O primeiro teste avaliou a via das caspases após 24 horas de tratamento, utilizando esferóides de HUVEC expostas às concentrações de 100 nM, 1000 nM e 10.000 nM das duas proteínas recombinantes. O objetivo deste ensaio foi estudar a ativação da via apoptótica dependente da clivagem proteolítica de caspases, cuja ativação desencadeia a morte celular ordenada da célula. A Figura 8. demonstra que ambas as proteínas estão ativas, sendo que a DisBa-01 purificada sem ureia apresentou maior atividade na concentração 10.000nM quando comparada à DisBa-01 descrita por Ramos et al., 2008. Além disso, embora a captação de fluorescência tenha sido maior nos esferóides tratados com DisBa-01 sem ureia (Figura 8C e 8D), ambos os tratamentos apresentaram ativação da via apoptótica, este resultado corrobora com o trabalho de Ribeiro (2013), onde as células HUVEC tratadas com DisBa-01 apresentaram aumento de apoptose associado à perda de adesão, possivelmente indicando que a DisBa ao bloquear a integrina $\alpha\beta3$, estimulando a morte celular em células que dependem desse receptor para adesão

e sobrevivência. Embora, mostrou-se que a proteína obtida por esse trabalho apresentou atividade biológica maior em relação a descrita por Ramos et al., 2008.

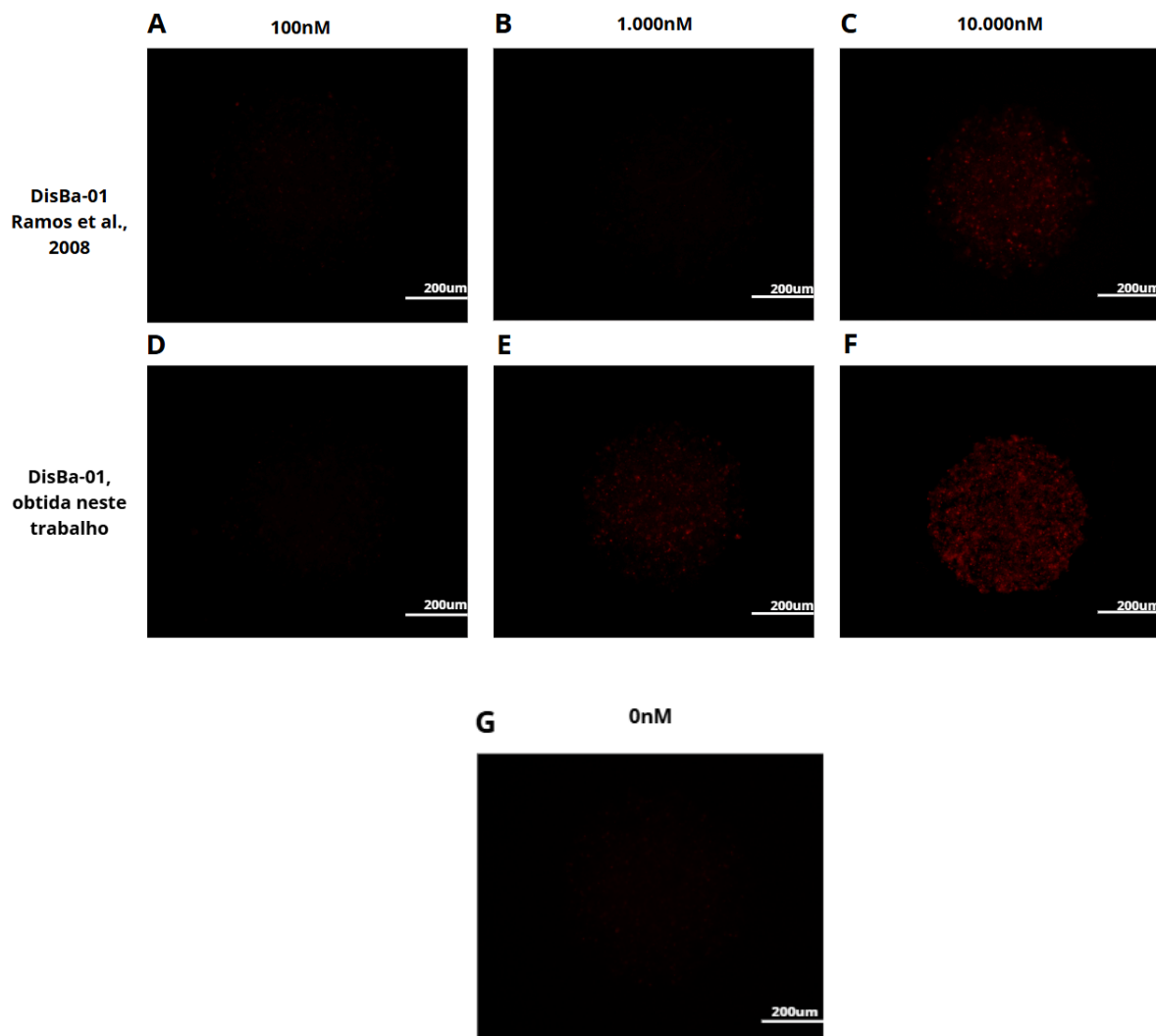
Figura 8. Esferóides de HUVEC submetidos ao ensaio de ativação das caspases por fluorescência



Esferóides de HUVEC tratados com DisBa-01 Ramos et al., 2008 nas concentrações de 1.000 nM (A) e 10.000 nM (B), com DisBa-01 obtida neste trabalho nas concentrações de 1.000 nM (C) e 10.000 nM (D), e 0 nM - Controle (E). Fonte: Autora.

O segundo teste analisou a viabilidade celular (Live/Dead) dos esferóides após 72 horas de incubação, nas mesmas concentrações (100 nM, 1000 nM e 10.000 nM), buscando analisar a citotoxicidade dependente da concentração. Os esferóides de MDA-MB-231 submetidos às mesmas concentrações de ambas proteínas apresentaram efeitos biológicos distintos, bem como foi possível verificar maior mortalidade celular em concentrações elevadas de DisBa-01 obtida por esse protocolo (Figura 9.). Esse resultado pode ser justificado pela capacidade da DisBa-01 de interagir com as integrinas expressas pela linhagem MDA-MB-231, incluindo a $\alpha\beta3$, modificando as interações célula-matriz que são essenciais para a sobrevivência celular, levando, portanto, a mortalidade celular (Altei et al., 2020; Danilucci et al., 2019).

Figura 9. Esferóides de MDA-MB-231 avaliados pelo ensaio de viabilidade Live/Dead por fluorescência



Esferóides de MDA-MB-231 tratados com DisBa-01 Ramos et al. 2008 nas seguintes condições, respectivamente: (A) 100 nM; (B) 1.000 nM; e (C) 10.000 nM, utilizando o protocolo de purificação de Ramos (2008); e (D) 100 nM; (E) 1.000 nM; e (F) 10.000 nM, utilizando a preparação purificada sem ureia. (G) 0nM - Controle. Fonte: Autora.

Sendo assim, foi possível confirmar, por meio deste experimento, que a proteína recombinante purificada neste trabalho apresentou atividade funcional superior à obtida pelo protocolo descrito por Ramos et al. (2008). A utilização do presente protocolo mostrou-se vantajosa para a manutenção da atividade biológica da proteína recombinante, com base nos resultados obtidos nos experimentos apresentados nas Figuras 8 e 9. Os dados sugeriram que a DisBa-01 descrita por Ramos et al. (2008) possivelmente perdeu atividade biológica durante as etapas de

recuperação e refolding, como nas diálises. Dessa forma, a obtenção da proteína recombinante em sua forma solúvel permitiu maior concentração de proteínas em sua conformação nativa em comparação ao protocolo anteriormente descrito.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo a obtenção da proteína recombinante com domínio RGD, denominada DisBa-01, por meio de um protocolo de purificação em condições não desnaturantes, visando a otimização do processo e a preservação de sua atividade biológica. A estratégia adotada permitiu a obtenção da proteína em sua forma solúvel, reduzindo a necessidade de etapas adicionais de refolding comumente empregadas em protocolos tradicionais.

Após a purificação, foram realizados ensaios com o intuito de avaliar a atividade biológica da DisBa-01. Embora o ensaio de migração Transwell não tenha apresentado significância estatística, indicando a necessidade de sua repetição, os testes de atividade de caspases e de viabilidade celular demonstraram que a proteína permaneceu biologicamente ativa. Além disso, os resultados obtidos indicaram que a atividade funcional da DisBa-01 purificada em condições não desnaturantes foi maior àquela descrita no protocolo de Ramos et al. (2008), no qual a proteína é obtida sob condições desnaturantes seguidas de refolding.

Portanto, os resultados deste estudo sugerem que o protocolo proposto constitui uma alternativa viável para a obtenção da DisBa-01 recombinante, com potencial para simplificar o processo de purificação e minimizar perdas de atividade biológica, contribuindo para futuras aplicações experimentais dessa proteína.

REFERÊNCIA

Altei, WF, Pachane, BC, dos Santos, PK *et al.* A inibição da integrina $\alpha\beta 3$ prejudica a adesão e a captação de pequenas vesículas extracelulares derivadas de tumores. *Cell Commun Signal* 18 , 158 (2020).<https://doi.org/10.1186/s12964-020-00630-w>.

Bergholz JS, Zhao JJ. How Compensatory Mechanisms and Adaptive Rewiring Have Shaped Our Understanding of Therapeutic Resistance in Cancer. *Cancer Res.* 2021 Dec 15;81(24):6074-6077. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-3605. PMID: 34911779; PMCID: PMC9033251.

Casali BC, Gozzer LT, Baptista MP, Alteí WF, Selistre-de-Araújo HS. The Effects of $\alpha\beta 3$ Integrin Blockage in Breast Tumor and Endothelial Cells under Hypoxia In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 3;23(3):1745. doi: 10.3390/ijms23031745. PMID: 35163668; PMCID: PMC8835904.

Danilucci TM, Santos PK, Pachane BC, Pisani GFD, Lino RLB, Casali BC, Alteí WF, Selistre-de-Araújo HS. Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin $\alpha\beta 3$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Cell Commun Signal.* 2019 Mar 20;17(1):27. doi: 10.1186/s12964-019-0339-1. PMID: 30894182; PMCID: PMC6425665.

Dhaliwal, D., Shepherd, T.G. Molecular and cellular mechanisms controlling integrin-mediated cell adhesion and tumor progression in ovarian cancer metastasis: a review. *Clin Exp Metastasis* 39, 291–301 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10585-021-10136-5>

Galloway CA, Sowden MP, Smith HC. Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. *Biotechniques.* 2003 Mar;34(3):524-6, 528, 530. doi: 10.2144/03343st04. PMID: 12661158.

Greenwood SN, Belz RG, Weiser BP. A Conserved Mechanism for Hormesis in Molecular Systems. *Dose Response.* 2022 Aug 2;20(3):15593258221109335. doi: 10.1177/15593258221109335. PMID: 35936511; PMCID: PMC9350523.

Hashemzadeh MS, Mohammadi M, Ghaleh HEG, Sharti M, Choopani A, Panda AK. Expression, Solubilization, Refolding and Final Purification of Recombinant Proteins as Expressed in the form of "Classical Inclusion Bodies" in *E. coli*. *Protein Pept Lett.* 2021;28(2):122-130. doi: 10.2174/0929866527999200729182831. PMID: 32729411.

Kadry YA, Maisuria EM, Huet-Calderwood C, Calderwood DA. Differences in self-association between kindlin-2 and kindlin-3 are associated with differential

integrin binding. *J Biol Chem.* 2020 Aug 7;295(32):11161-11173. doi: 10.1074/jbc.RA120.013618. Epub 2020 Jun 16. PMID: 32546480; PMCID: PMC7415974.

Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jul;2(7):a006502. doi: 10.1101/cshperspect.a006502. PMID: 22762016; PMCID: PMC3385940.

Li S, Sampson C, Liu C, Piao HL, Liu HX. Integrin signaling in cancer: bidirectional mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Commun Signal.* 2023 Sep 28;21(1):266. doi: 10.1186/s12964-023-01264-4. PMID: 37770930; PMCID: PMC10537162.

Lino RLB, Dos Santos PK, Pisani GFD, Altei WF, Cominetti MR, Selistre-de-Araújo HS. Alphavbeta3 integrin blocking inhibits apoptosis and induces autophagy in murine breast tumor cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019 Dec;1866(12):118536. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.118536. Epub 2019 Aug 26. PMID: 31465809.

Mezu-Ndubuisi, O.J., Maheshwari, A. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatr Res* 89, 1619–1626 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01177-9>

Montenegro CF, Casali BC, Lino RLB, Pachane BC, Santos PK, Horwitz AR, Selistre-de-Araujo HS, Lamers ML. Inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin induces loss of cell directionality of oral squamous carcinoma cells (OSCC). *PLoS One.* 2017 Apr 24;12(4):e0176226. doi: 10.1371/journal.pone.0176226. PMID: 28437464; PMCID: PMC5402964.

Montenegro CF, Salla-Pontes CL, Ribeiro JU, Machado AZ, Ramos RF, Figueiredo CC, Morandi V, Selistre-de-Araujo HS. Blocking $\alpha\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie.* 2012 Aug;94(8):1812-20. doi: 10.1016/j.biochi.2012.04.020. Epub 2012 Apr 27. PMID: 22561350.

O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 2006 Feb 1;66(3):1500-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2925. PMID: 16452206; PMCID: PMC3193604.

Ramos OH, Kauskot A, Cominetti MR, Bechyne I, Salla Pontes CL, Chareyre F, Manent J, Vassy R, Giovannini M, Legrand C, Selistre-de-Araujo HS, Crépin M, Bonnefoy A. A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis.

Clin Exp Metastasis. 2008;25(1):53-64. doi: 10.1007/s10585-007-9101-y. Epub 2007 Oct 19. PMID: 17952617.

Ribeiro, L. C., Massimino, L. C., Durante, A. C., Tansini, A., Urbaczek, A. C., Selistre-de-Araújo, H. S., & Carlos, I. Z. (2013). Recombinant disintegrin targets $\alpha(v)\beta(3)$ integrin and leads to mediator production. *Cell Adhesion & Migration*, 8(1), 60–65. <https://doi.org/10.4161/cam.27698>

Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, AK et al. Recuperação de proteínas de corpos de inclusão de *Escherichia coli* usando um processo de solubilização suave. *Microb Cell Fact* 14 , 41 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>.

Sørensen, HP, Mortensen, KK Expressão solúvel de proteínas recombinantes no citoplasma de *Escherichia coli* . *Microb Cell Fact* 4 , 1 (2005). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-1>