

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

“DESINTEGRINAS DE *Bothrops alternatus*: BIOLOGIA MOLECULAR,
ESTUDOS *IN VITRO*, *IN VIVO* E BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL”

OSCAR HENRIQUE PEREIRA RAMOS

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

SÃO CARLOS - SP
2005

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

R175db

Ramos, Oscar Henrique Pereira.

Desintegrinas de *Bothrops alternatus*: biologia molecular, estudos *in vitro*, *in vivo* e bioinformática estrutural / Nely Tocantins. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
152 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Biologia molecular. 2. Biotecnologia. 3. Desintegrinas.
4. Trombose venosa. 5. Câncer. 6. Bioinformática I. Título.

CDD: 574.8 (20^a)

*... será que vale a pena vivermos conformados em um mundo aquém de
nossos anseios?*

*... se não chegarmos a ver o mundo que sonhamos, podemos nos
alimentar de pequenas conquistas e terminar nossos dias satisfeitos...*

... pois, o que é a morte se não a submissão à desprezível acomodação?

*Dedico este trabalho a pessoas que sempre estiveram presentes em minha vida, meus pais: **Maria Ignez Pereira Ramos** e **Oscar Longuinhos Ramos** por toda luta, ensinamentos, compreensão, afeto e pelo orgulho que me fazem sentir de suas trajetórias.*

*Dedico também aos meus irmãos: **Felipe Pereira Ramos** e **Diego Pereira Ramos** por serem parte do que sou e por junto com meus pais representarem meu porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha namorada Jimena Garcia Menendez por seu amor incondicional, companheirismo, paciência, compreensão, auxílio e esforço para conquistarmos uma vida em comum.

Agradeço aos amigos Samir Adib de Souza Leme (“Sazinho”) pela duradoura amizade, agora com cerca de vinte anos. Igualmente ao amigo Mário Augusto Paino por tantos anos compartilhados, incentivos e pela participação na formação de meu caráter.

Agradeço a minha orientadora de iniciação científica Profa. Dra. Luciane Cruz Lopes (UNIMEP – Piracicaba) por sua grande influência em minha formação científica, assim como por seus exemplos de determinação e coragem. Aproveito para agradecer as amigas Juliana Siqueira Chaves (“Jú”), Carla Franco Penteado e Sônia Regina Riado pela duradoura amizade.

Agradeço ao amigo Renner de Souza Leite, por mostrar que a simplicidade e bom humor são boas formas de se viver. Também pela companhia em momentos difíceis ou de alegria (“baladas”).

Agradeço ao casal Márcia Regina Cominetti e Rodrigo Constante Martins por vários momentos de discussão científico-filosófica (“ou não”) regada à cerveja em ambientes descontraídos.

Aos amigos de laboratório com os quais foram compartilhados conhecimentos e experiências: Cristina Helena Bruno Terrugi (“Julia Roberts”), Marcelo Muniz Rossa, Mônica Rosas da Costa Lemma, Caroline Krieger de Moraes (Carol), Raquel Agnelli Mesquita (“corneteira”), Ademar de Souza Nogueira (“corneteiro”), Juliana Uema Ribeiro (Jú) e Carmen Lúcia Salla Pontes

pela amizade, auxílio técnico e discussões. Em especial agradeço a “equipe de recuperação” do clone que contém o pDisBa-01 por sua atitude durante minha estadia na França.

Aos amigos e colaboradores do Instituto de Física - Universidade de São Paulo (USP): Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, Profa. Dra. Leila Maria Beltramini, Prof. Dr. Glaucius Oliva, Prof. Dr. Richard Garratt, Prof. Dr. Otávio Thiemann, Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza pelo incentivo, intercâmbio de conhecimentos, discussões e companheirismo.

Agradeço igualmente a Profa. Dra. Lina Zingali (UFRJ) e a seu grupo de pesquisa pelo apoio e colaboração.

Agradeço ao amigo Dr. Humberto d’Muniz Pereira (Cientistas Associados) por sua simplicidade, bom senso, parceria e intercâmbio científico. Também agradeço aos amigos Sandro Hillebrand, Cláudio Policastro e André Pereira (Cientistas Associados) pela amizade e confiança.

Agradeço aos novos amigos que conheci na França, Lawrence Pupulin (“cinco”), Onésimo (paquera da menina de olhinhos “assim”), Mateus (das “gatchinhas”), Ana Ávila Pinto (“aninha”), Soraya Mour, Beatriz Lipinski (“Bia”), Rodnei Nascimento, Zé, Aécio, Emerson, Samira Otto, Renata, Krishna, Audrey, Nilton, Clewton, Paulo, Emilie, Débora (Barbe), Amaranta, Juvenal e Emanuel, por tornarem minha estadia mais agradável.

Agradeço aos colegas da unidade 553 do INSERM (Paris, França) por me acolheram durante minha estadia e pelo intercâmbio científico-cultural: Dra. Chantal Legrand, Dra. Françoise Fauvel-Lafève, Dra. Veronique Trochon-Joseph, Dra. Annick Thomaidis, Dra. Madeleine Berard, Dra. Monique Cristofari, Dra. Noelia Gomes, Dr. Fabrice, Martini, Dra. Mélanie di Bene, Thomas, Marie-Astrid

Herve, Geremie, Pascal Maurice, Sabrina Kellouche e pela colaboração e companheirismo. Em especial agradeço a Alexandre Kauskot pelos trabalhos em conjunto, assim como, ao Dr. Arnaud Bonnefoy pela colaboração realizada e por sua constante disponibilidade para prestar auxílio técnico-científico. Destaco meu agradecimento ao Prof. Dr. Michel Crépin por sua orientação durante meu estágio, mas, também por sua simpatia, simplicidade, bom senso, paciência e capacidade científica.

Agradeço especialmente a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) e a CAPES por acreditarem em meus projetos e pelo apoio financeiro.

Agradeço também a todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para o bom andamento deste trabalho e que certamente foram indispensáveis.

Por fim, gostaria de agradecer a Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo por mais esse período de trabalho em conjunto, por seu bom senso e por sua constante preocupação em conduzir um trabalho de qualidade. Aproveito a ocasião para manifestar meu agradecimento por ter me concedido à oportunidade de continuar minha formação e pelo apoio constante. Novamente, muito foi aprendido nesse período e acredito que seu papel como orientadora foi plenamente cumprido.

RESUMO

Desintegrinas são toxinas frequentemente encontradas em venenos de serpentes e cujos efeitos biológicos relacionam-se com suas ligações a receptores celulares conhecidos como integrinas. Visando o isolamento de novas desintegrinas da serpente *Bothrops alternatus*, foi construída uma biblioteca de cDNA a partir de transcritos presentes nas glândulas veneníferas de um espécime dessa serpente. Duas desintegrinas, denominadas DisBa-01 e DisBa-02, foram clonadas e seqüenciadas. Também foi possível a amplificação de outras prováveis desintegrinas médias e metaloproteases-desintegrinas. A desintegrina, DisBa-01, foi expressa em um sistema bacteriano otimizado (*Escherichia coli* BL21(DE3) pET28a+DisBa-01) e testada em uma série de ensaios biológicos. A toxina recombinante inibiu a agregação plaquetária induzida por colágeno em plasma rico em plaquetas (PRP) de coelhos (IC₅₀= 235nM). Utilizando ADP como indutor também se constatou a inibição da agregação plaquetárias em PRP de coelho (IC₅₀= 124nM) e humano (IC₅₀= 475nM), além da inibição da agregação de plaquetas lavadas de camundongos (IC₅₀= 25nM). Em ensaios de competição pela da integrina α IIb β 3 na presença de ligantes específicos, obteve-se os IC₅₀s de 18 e 70nM, respectivamente, para o fibrinogênio e para um anticorpo específico contra a integrina ativada. A toxina inibiu ainda a proliferação de células com expressão mais representativa de integrina α V β 3, HMEC-1 e B16F10-2B8, de maneira dose/tempo dependente, bem como adesão de células B16F10-2B8 à vitronectina (IC₅₀= 225nM). *In vivo*, a toxina significativamente inibiu a formação de trombos em arteríolas (Experimental: 58,4 \pm 1,6 min; Controle: 24,3 \pm 2,8 min, p<0,002) e vênulas (Experimental: 46,6 \pm 6,8min.; Controle: 27,1 \pm 1,3min., p<0,002), prolongou o tempo de sangramento (Experimental: 989 \pm 140 segundos; Controle: 202 \pm 22 segundos; p<0,008) e inibiu a formação de metástases pulmonares (~92% no 12° dia após a injeção das células tumorais). Os resultados obtidos somados a estudos por bioinformática estrutural sugerem fortemente a ligação com integrinas como a α IIb β 3 e α V β 3, motivando o prosseguimento de estudos visando a aplicação terapêutica e/ou laboratorial da DisBa-01 ou possíveis derivados.

ABSTRACT

Disintegrins are toxins frequently found in snake venoms. Their biological effects are due to their binding to cell receptors known as integrins. Aiming to isolate new disintegrins from *Bothrops alternatus* snake, a cDNA library was constructed upon the transcripts expressed in the venom gland from one specimen. Two disintegrins, called DisBa-01 and DisBa-02 were cloned and sequenced. The amplification of other medium-size disintegrins and metalloprotease-disintegrins was also achieved. The recombinant toxin, DisBa-01, was expressed in an optimized bacterial system (*Escherichia coli* BL21(DE3) pET28a+DisBa-01) and tested in several biological assays. The toxin inhibited the platelet aggregation (IC_{50} = 235nM) induced by collagen in rabbit's platelets rich plasma (PRP). Using ADP as inductor, the platelet aggregation inhibition was also observed in PRP from rabbits (IC_{50} = 124nM) and human (IC_{50} = 475nM), as well as in washed platelets from mice (IC_{50} = 25nM). Competition assays for the $\alpha IIb\beta 3$ integrin using specific ligands, fibrinogen and a specific antibody against activated $\alpha IIb\beta 3$, revealed that the toxin strongly binds to this receptor (respectively IC_{50} =18nM and IC_{50} =70nM). Furthermore, the toxin inhibited the proliferation of cells that representatively express $\alpha V\beta 3$ integrin, HMEC-1 and B16F10-2B8, in a dose/time dependent manner and the adhesion of B16F10-2B8 to vitronectin (IC_{50} = 225nM). *In vivo*, the toxin significantly inhibited the thrombus formation in arterioles (Treated: $58,4 \pm 1,6$ min.; Control: $24,3 \pm 2,8$ min., $p < 0,002$) and venules (Treated: $46,6 \pm 6,8$ min.; Control: $27,1 \pm 1,3$ min., $p < 0,002$), prolonged the bleeding time (Treated: 989 ± 140 sec.; Control: 202 ± 22 sec.; $p < 0,008$) and inhibited the pulmonary metastasis of B16F10-2B8 (~92%, 12 days after the tumor cells injection). These results, as well as structural bioinformatics studies strongly suggest the binding of the toxin with $\alpha IIb\beta 3$ and $\alpha V\beta 3$ integrins, what motivates further studies aiming the therapeutic/laboratorial application of DisBa-01 or its derivatives.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DESCRIÇÃO
ADP:	adenosina difosfato
Å:	Angstrom, unidade de medida que corresponde a 10^{-10} metros.
ADAM:	proteína multimodular que apresenta os domínios de metaloprotease e similar a desintegrina (<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>)
ADAM-TS:	ADAM com domínio adicional que contém repetições do tipo 1 encontrados nas trombospondinas (<i>ADAM with Thrombospondin motifs</i>)
Alt-C:	alternagina-C, domínios tipo-desintegrina e rico em cisteínas da alternagina liberado por proteólise.
BAG:	metaloprotease-desintegrina dimérica de <i>Bothrops alternatus</i>
BCA:	ácido bicinchrônico (<i>Bicinchoninic Acid</i>)
bFGF:	fator básico de crescimento de fibroblastos (<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>)
BSA:	soro albumina bovina (B ovine S erum A lbumine)
BLAST:	programa computacional para busca de homologias locais entre DNAs ou proteínas (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>).
BLOSUM X:	matriz de substituição de aminoácidos construída com seqüências de proteínas com porcentagem de identidade inferior a "X" (<i>Blocks Substitution Matrix</i>).
BMP:	azul de bromofenol (<i>Blue bromophenol</i>)
Cα:	carbono alfa – átomo de carbono no qual as cadeias laterais de aminoácidos encontram-se ligadas.
CAS:	substrato associado a CRK (<i>CRK Associated Substrate</i>)
cDNA:	DNA complementar a um mRNA.
CMFDA:	diacetato de 5-clorometilfluoresceína
DisBa-01:	primeira desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i> clonada nesse projeto
DisBa-02:	segunda desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i> clonada nesse projeto
Da:	dalton(s), unidade de massa molecular
dATP:	deoxiadenosina trifosfato (nucleotídeo purínico)
dCTP:	deoxicitosina trifosfato (nucleotídeo pirimidínico)
dGTP:	deoxiguanosina trifosfato (nucleotídeo purínico)
DisBa:	desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA:	ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxiribonucleic acid</i>)

continua

continuação

- dNTP:** desoxinucleotídeos trifosfatados
- D.O.x:** densidade óptica para um comprimento de onda de “X” nm
- dTTP:** deoxitimidina trifosfato (nucleotídeo pirimidínico)
- DTT:** DL-Ditiotreitol
- E. coli:** *Escherichia coli*
- ECM:** matrix extracelular (*Extracellular Matrix*)
- EDTA:** ácido etilenodiaminotetraacético
- EGF:** fator de crescimento de epiderme (*Epidermal Growth Factor*)
- ERK:** quinase regulada por sinal extracelular (*Extracellular Regulated Kinase*)
- FACS:** citometria de fluxo (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)
- FBS:** soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)
- fMLP:** formil-metionil-leucil-fenilalanina
- g:** unidade de força rotocentrífuga (gravidades) ou unidade de massa (grama)
- HEPES:** ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
- HMEC:** células endoteliais humanas de microvasculatura de derme (*Human Microvascular Endothelial Cell*)
- HPLC:** cromatografia líquida de alta precisão (*High Precision Liquid Chromatography*)
- HUVEC:** células endoteliais de vascular umbilical humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*)
- IBs:** corpos de inclusão (*Inclusion Bodies*)
- ICAM:** molécula de adesão intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule*)
- IECA:** inibidores da enzima conversora de angiotensina
- IL:** Interleucina
- i.p.:** injeção intraperitoneal
- IPTG:** isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
- Kan:** canamicina, um antibiótico aminoglicosídeo que interfere na síntese protéica bacteriana
- LB:** meio de cultura de bactérias (*Luria Bertani*)
- LIBS:** sítio de ligação induzido por ligante, epítipo criado por mudança conformacional em integrinas na interação de integrinas com certos ligantes (*Ligand Induced Binding Site*)

continua

continuação

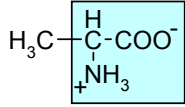
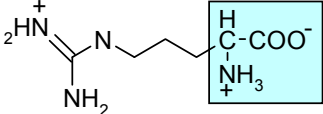
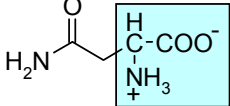
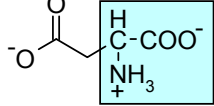
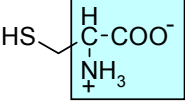
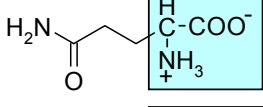
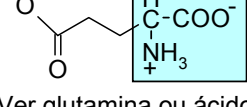
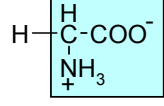
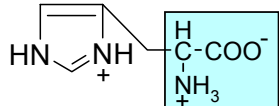
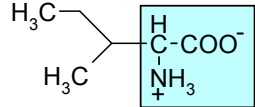
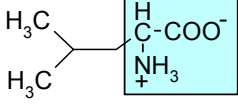
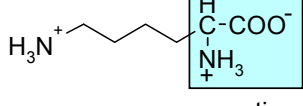
- mRNA:** ácido ribonucléico mensageiro (*messenger ribonucleic acid*)
- m/m:** massa/massa (proporção)
- MMPs:** metaloproteases que digerem proteínas da matrix extracelular (*Matrix Metalloproteases*)
- MOPS:** 3-[N-morfolino]propano-ácido sulfônico
- MPs:** metaloproteases
- Mt-MMPs:** MMPs ancoradas a membrana plasmática (*Membrane type MMPs*)
- NCAM:** molécula de adesão de células neurais (*Neural Cell Adhesion Molecule*)
- nm:** nanômetros - unidade de medida correspondente a 10^{-9} metros
- NMR:** ressonância nuclear magnética (*Nuclear Magnetic Resonance*)
- NCBI:** Centro de Informações Biotecnológicas dos Estados Unidos da América (*National Center for Biotechnology Information*)
- ORF:** fase de leitura aberta (*Open Reading Frame*)
- PAI:** inibidores de ativadores de plasminogênio (*Plasminogen Activator Inhibitors*)
- pb:** pares de bases
- PBS:** salina tamponada por fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)
- PCR:** reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- pDisBa-01:** plasmídeo recombinante obtido pela ligação com o produto da amplificação dos oligonucleotídeos F1 e R1 (tabela 10) utilizando a biblioteca de cDNAs de *Bothrops alternatus* como molde.
- PFU:** unidades formadoras de placas (*Plate Forming Units*)
- PDB:** banco de dados de estruturas tridimensionais (*Protein Data Bank*)
- .pdb:** arquivos de informações tridimensionais no formato PDB
- PI3K:** fosfatidilinositol 3 quinase (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*)
- poli-dA** oligonucleotídeo composto de poli-desoxiadeninas
- poli-dT** oligonucleotídeo composto de poli-desoxitimidinas
- ppt:** Precipitado
- q.s.p.:** quantidade suficiente para:
- RGD:** seqüência arginina-glicina-ácido aspártico, presente em desintegrinas e relacionado com a ligação com integrinas portadoras de subunidade $\beta 3$
- RMS:** raiz média quadrada (*Root Mean Square*)
- rpm:** rotações por minuto

continua

continuação

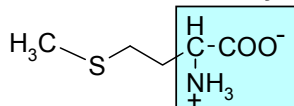
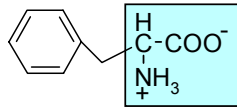
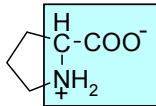
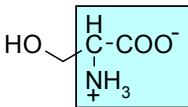
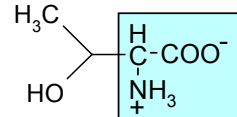
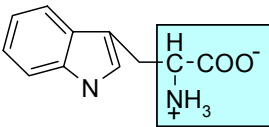
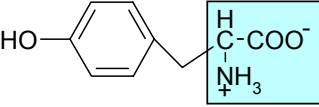
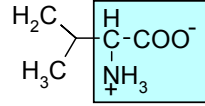
- RT-PCR:** transcrição reversa acoplada a reação em cadeia da polimerase (*Reverse Transcription PCR*)
- S1:** sobrenadante de extrato celular obtido em condições não desnaturantes, após expressão heteróloga
- S2:** sobrenadante de extrato celular obtido em condições desnaturantes, após expressão heteróloga
- SDS:** duodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio (*Sodium Duodecyl Sulfate*)
- SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poli(acrilamida com **SDS** (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
- svMPs:** metaloproteases de veneno de serpente (*Snake Venom Metalloproteases*)
- TBS:** solução tamponada com NaCl e Tris (*Tris Buffered Saline*)
- TFA:** ácido trifluoroacético (*Trifluoroacetic acid*)
- TIMP:** Inibidores tissulares de metaloproteases (*Tissue Inhibitors of Metalloproteases*)
- TNF- α** fator de necrose tumoral α (*Tumor necrosis factor α*)
- Tris:** tris[hidroximetil]aminometano
- TyrK:** tirosina quinase (*Tyrosine Kinase*)
- t-PA:** ativador tissular de plasminogênio (*tissular-Plasminogen Activator*)
- u-PA:** ativador de plasminogênio tipo uroquinase (*Urokinase-type Plasminogen Activator*)
- uPAR:** receptor de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (*urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*)
- UFC:** unidades formadoras de colônia
- V0:** volume inicial
- VCAM:** molécula de adesão de célula vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule*)
- VEGF:** fator de crescimento vascular e endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
- XTT:** 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

AMINOÁCIDOS

Nome	1 letra	3 letras	Estrutura
Alanina	A	Ala	
Arginina	R	Arg	
Asparagina	N	Asn	
Ácido aspártico	D	Asp	
Asparagina ou Ácido aspártico	B	Asx	Ver asparagina ou ácido aspártico
Cisteína	C	Cys	
Glutamina	Q	Gln	
Ácido Glutâmico	E	Glu	
Glutamina ou Ácido Glutâmico	Z	Glx	Ver glutamina ou ácido glutâmico
Glicina	G	Gly	
Histidina	H	His	
Isoleucina	I	Ile	
Leucina	L	Leu	
Lisina	K	Lys	

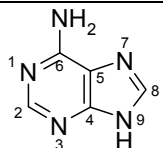
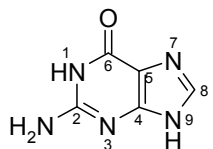
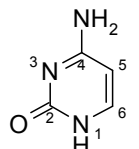
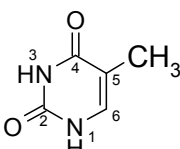
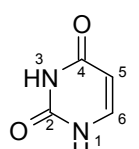
continua

continuação

Metionina	M	Met	
Fenilalanina	F	Phe	
*Prolina	P	Pro	
Serina	S	Ser	
Treonina	T	Thr	
Triptofano	W	Trp	
Tirosina	Y	Tyr	
Valina	V	Val	

* Por definição, a prolina é considerada um iminoácido.

BASES NITROGENADAS

Nome	Código	Complemento	Estrutura
Adenina (6-aminopurina)	A	T	
Guanina (2-amino-6-oxipurina)	G	C	
Citosina (2-oxi-4-aminopirimidina)	C	G	
Timina (2,4-dioxi-5-metilpirimidina)	T	A	
Uracila (2,4-dioxipirimidina)	U	A	
Adenosina ou Citosina	M	K	Ver estrutura acima
Adenosina ou Guanina	R	Y	Ver estrutura acima
Adenina ou Timina	W	W	Ver estrutura acima
Citosina ou Guanina	S	S	Ver estrutura acima
Citosina ou Timina	Y	R	Ver estrutura acima
Guanina ou Timina	K	M	Ver estrutura acima
Adenina, Citosina ou Guanina	V	B	Ver estrutura acima
Adenina, Citosina ou Timina	H	D	Ver estrutura acima
Adenina, Guanina ou Timina	D	H	Ver estrutura acima
Citosina, Guanina ou Timina	B	V	Ver estrutura acima
Uma das quatro (A, C, G ou T)	N	N	Ver estrutura acima
Nenhuma das quatro (A, C, G ou T)	-	-	Ver estrutura acima

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Integrinas, seus ligantes endógenos e distribuição celular.....	11
Tabela 2: Moléculas de adesão em células endoteliais associadas a interações com células tumorais.	22
Tabela 3: Características de domínios desintegrina baseando-se em seqüência, padrão de pontes de dissulfeto e relações evolucionárias	29
Tabela 4: Domínios desintegrina com estrutura resolvida	30
Tabela 5: Cepas bacterianas de <i>Escherichia coli</i>	46
Tabela 6: Linhagens celulares.....	46
Tabela 7: Vetores.....	46
Tabela 8: Enzimas de restrição.	46
Tabela 9: Outras enzimas utilizadas nos processos de tecnologia do DNA recombinante.	47
Tabela 10: Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	47
Tabela 11: Marcadores de Massa Molecular.	47
Tabela 12: Kits.....	48
Tabela 13: Outros reagentes.	48
Tabela 14: Resinas cromatográficas	48
Tabela 15: Equipamentos.....	48
Tabela 16: Componentes das reações de PCR.....	55
Tabela 17: Componentes das reações de clonagem no vetor TOPO TA.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A adesão e o destino celular (Extraído de GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1999)	3
Figura 2: Estrutura da integrina $\alpha V\beta 3$	6
Figura 3: Estrutura do β -propulsor presente na subunidade αV	7
Figura 4: Interação entre os domínios β -propulsor (subunidade αV) e β -A (subunidade $\beta 3$)	9
Figura 5: Similaridade do aspecto de interação entre β -propulsor/domínio β -A (integrina $\alpha V\beta 3$) e entre subunidades β/α (proteínas G).....	9
Figura 6: Integração do meio intra e extracelular através de integrinas.....	12
Figura 7: Sinalização por integrinas e inter-relação com outras vias sinalizadoras (Extraído de HANAHAN e WEINBERG, 2000).	15
Figura 8: Comunicação entre integrinas e trans-dominância	17
Figura 9: Principais vias de interação de células tumorais com o sistema hemostático.....	23
Figura 10. Angiogênese fisiológica	25
Figura 11: Precusores de metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) e desintegrinas.....	28
Figura 12: Estruturas de desintegrinas	31
Figura 13: Programa utilizado nas reações de PCR	55
Figura 14: Análise da qualidade da amostra de RNA total por eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído	71
Figura 15: Quantificação aproximada dos cDNAs obtidos	72
Figura 16: Amplificação de desintegrinas pela RT-PCR	73
Figura 17: Amplificação de metaloproteinase-desintegrinas e da BaG pela RT-PCR.....	74
Figura 18: Análise de restrição do plasmídeo pDisBa-01	75
Figura 19: Seqüência de nucleotídeos e de resíduos de aminoácido deduzido a partir do pDisBa-01	76
Figura 20: Multialinhamento de seqüências de desintegrinas RGD: O motivo RGD é representado em negrito.....	77
Figura 21: Seqüência de nucleotídeos e de resíduos de aminoácido deduzidas a partir do pDisBa-02	78
Figura 22: Expressão heteróloga da DisBa-01 utilizando a linhagem BL21(DE3) de <i>Escherichia coli</i>	79
Figura 23: Purificação de frações eluídas da resina de Ni-NTA por gel filtração (Sephadex G-75).....	80
Figura 24: Análise de frações obtidas por gel filtração (Sephadex G-75) em gel de tricina.....	81
Figura 25: Cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) por interação hidrofóbica em coluna C8.	81
Figura 26: Caracterização de integrinas de superfície por citometria de fluxo	82
Figura 27: Efeito da DisBa-01 na agregação plaquetária induzida por colágeno (0,0025%) em PRP de coelho.....	83
Figura 28: Efeito da DisBa-01 na agregação plaquetária induzida por ADP (5 μ M) em PRP de coelho.....	84

Figura 29: Efeito da DisBa-01 na agregação plaquetária induzida por ADP (10 μ M) em PRP humano	85
Figura 30: Efeito da DisBa-01 na agregação de plaquetas lavadas de camundongos.....	85
Figura 31: Ensaios de competição entre a DisBa-01 e ligantes da integrina α IIb β 3 ativada de plaquetas.....	86
Figura 32: Efeito da DisBa-01 na proliferação de células MD-MB-231	87
Figura 33: Efeito da DisBa-01 na proliferação de células HMEC-1.....	87
Figura 34: Efeito da DisBa-01 na proliferação de células B16F10-2B8	88
Figura 35: Inibição da adesão de células B16F10-2B8 à vitronectina pela DisBa-01	89
Figura 36: Efeito da DisBa-01 na trombose experimental induzida por FeCl ₃ (500mM) em agar (1%).....	90
Figura 37: Evolução da trombose induzida por FeCl ₃ em arteríolas (a) e vênulas (v) mesentéricas de camundongos	90
Figura 38: Prolongamento do tempo de sangramento pela DisBa-01	91
Figura 39: Monitoramento do sinal de bioluminescência após a aplicação de luciferina.....	92
Figura 40: Efeito da administração única da DisBa-01 na implantação e desenvolvimento de metástases pulmonares de células B16F10-2B8 em modelo isogênico	93
Figura 41: Análise histológica de pulmões dos camundongos submetidos ao ensaio de metástase <i>in vivo</i> (aumento de 40x).....	94
Figura 42: Teste de citotoxicidade fatal aguda em células B16F10-2B8	95
Figura 43: Alinhamento de sequências envolvendo os moldes utilizados, Trimestatina (1J2L) e Flavoridina (1FVL), e a DisBa-01.	96
Figura 44: Modelo estrutural da DisBa-01	96
Figura 45: Modelo estrutural da superfície e cargas da DisBa-01	97
Figura 46: Aspecto da interação geométrica entre a DisBa-01 e a integrina α V β 3.....	98
Figura 47: Pontes de hidrogênio entre o motivo RGD da DisBa-01 e a integrina α V β 3.....	99
Figura 48: Sobreposição estrutural da DisBa-01 livre e ligada a integrina α V β 3.....	100
Figura 49: Regiões geográficas correspondentes os <i>habitat</i> da espécie <i>Bothrops alternatus</i> (urutu)	101

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1.1. ADESÃO E COMPORTAMENTO CELULAR.....	2
1.1.1. <i>Integrinas: Estrutura</i>	4
1.1.2. <i>Integrinas: Função</i>	10
1.2. TUMORIGÊNESE E EVENTOS RELACIONADOS	18
1.2.1. <i>Intravasamento</i>	19
1.2.2. <i>Ancoragem e extravasamento</i>	20
1.2.3. <i>Crescimento tumoral</i>	23
1.2.4. <i>Angiogênese fisiológica e tumoral</i>	24
1.3. DESINTEGRINAS	26
1.3.1. <i>Origem e classificação</i>	27
1.3.2. <i>Estrutura</i>	29
1.3.3. <i>Efeitos biológicos</i>	33
1.3.4. <i>Aplicações</i>	36
1.3.5. <i>Relação com domínios desintegrina de mamíferos</i>	37
1.4. DOENÇAS POTENCIALMENTE TRATÁVEIS PELA INIBIÇÃO DE INTEGRINAS.....	38
1.4.1. <i>Câncer</i>	39
1.4.2. <i>Trombose</i>	39
1.4.3. <i>Osteoporose</i>	40
1.5. O CENÁRIO FARMACÊUTICO BRASILEIRO	42
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	44
3. MATERIAIS	46
4. MÉTODOS	49
4.1. OBTENÇÃO DE MRNAS	50
4.1.1. <i>Extração de RNAs totais</i>	50
4.1.2. <i>Purificação de RNAs mensageiros (mRNAs)</i>	51
4.2. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNAs	51
4.2.1. <i>Síntese do cDNA</i>	51
4.2.2. <i>Ligação no vetor Uni-ZAP XR</i>	52
4.2.3. <i>Empacotamento viral do produto da ligação</i>	53
4.2.4. <i>Preparo das linhagens hospedeiras</i>	53
4.2.5. <i>Titulação e plaqueamento dos bacteriófagos</i>	54
4.2.6. <i>Amplificação da biblioteca de bacteriófagos recombinantes</i> ...	54
4.3. TRIAGEM DA BIBLIOTECA E SUBCLONAGENS.....	55
4.3.1. <i>Sequenciamento automático de DNA</i>	57
4.4. CARACTERIZAÇÕES BIOQUÍMICAS E CELULARES	57
4.4.1. <i>Ensaio de expressão e solubilidade</i>	57
4.4.2. <i>Purificação da proteína heteróloga</i>	58
4.4.3. <i>Linhagens e culturas celulares</i>	59
4.4.4. <i>Caracterização de integrinas por FACS</i>	61
4.5. EFEITOS “IN VITRO”	62
4.5.1. <i>Efeito na agregação plaquetária e ligação com a integrina</i> <i>αIIbβ3</i>	62
4.5.2. <i>Efeito na proliferação celular</i>	64
4.5.3. <i>Efeito na adesão de células B16F10-2B8 à vitronectina</i>	64
4.6. EFEITOS “IN VIVO”	66
4.6.1. <i>Efeito no tempo de sangramento e na trombose</i>	66

4.6.2.	<i>Efeito na metástase de células B16F10-2B8</i>	67
4.7.	TOXICIDADE “IN VITRO” E “IN VIVO”	67
4.8.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	68
4.9.	ESTUDOS TEÓRICOS POR BIOLOGIA ESTRUTURAL	68
4.9.1.	<i>Modelagem molecular</i>	68
4.9.2.	<i>Modelagem do complexo com a integrina $\alpha V\beta 3$</i>	69
4.9.3.	<i>Avaliação dos modelos gerados</i>	70
5.	RESULTADOS	71
5.1.	OBTENÇÃO DE MRNAs	71
5.2.	CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNAs	72
5.3.	TRIAGEM DA BIBLIOTECA E SUBCLONAGENS	72
5.3.1.	<i>Análise de restrição</i>	74
5.3.2.	<i>Seqüenciamento automático de DNA</i>	75
5.4.	CARACTERIZAÇÕES BIOQUÍMICAS E CELULARES	78
5.4.1.	<i>Expressão e solubilidade</i>	78
5.4.2.	<i>Purificação</i>	79
5.4.3.	<i>Caracterização de integrinas por FACS</i>	82
5.5.	EFEITOS “IN VITRO”	83
5.5.1.	<i>Efeito na agregação plaquetária</i>	83
5.5.2.	<i>Efeito na proliferação celular</i>	86
5.5.3.	<i>Efeito na adesão de células B16F10-2B8 à vitronectina</i>	88
5.6.	EFEITOS “IN VIVO”	89
5.6.1.	<i>Efeito no tempo de sangramento e na trombose</i>	89
5.6.2.	<i>Efeito na metástase tumoral de células B16F10-2B8</i>	91
5.7.	TOXICIDADE “IN VITRO” E “IN VIVO”	94
5.8.	ESTUDOS TEÓRICOS POR BIOLOGIA ESTRUTURAL	95
5.8.1.	<i>Modelagem molecular da DisBa-01</i>	95
5.8.2.	<i>Modelagem do complexo integrina $\alpha V\beta 3$-DisBa-01</i>	97
5.8.3.	<i>Avaliação dos modelos gerados</i>	100
6.	DISCUSSÃO	101
6.1.	PRODUÇÃO DA TOXINA RECOMBINANTE	103
6.2.	EFEITOS NA HEMOSTASIA	107
6.3.	EFEITOS ANTI-TUMORAIS	109
6.4.	ESTUDOS PREDITIVOS POR BIOLOGIA COMPUTACIONAL	114
6.5.	DISCUSSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	115
7.	CONCLUSÕES	119
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
9.	ANEXOS	145
9.1.	MÉTODOS AMPLAMENTE DIFUNDIDOS	145
9.1.1.	<i>Eletroforese em gel de agarose</i>	145
9.1.2.	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	145
9.1.3.	<i>Eletroforese em gel de tricina</i>	146
9.1.4.	<i>Monitoramento do isolamento de mRNAs</i>	146
9.1.5.	<i>Preparação de células competentes</i>	147
9.1.6.	<i>Transformação de células competentes</i>	148
9.2.	MEIOS DE CULTURA	149
9.3.	GÉIS	150
9.4.	SOLUÇÕES	151
9.5.	ARQUIVOS DISPONÍVEIS EM DISCO COMPACTO (CD)	152

1. INTRODUÇÃO

Se a arte imita a vida (e vice-versa) é bem provável que a ciência também o faça. Popularmente se diz que “O bem e o mal são dois lados da mesma moeda”. Curiosamente, a sabedoria popular vem encontrando respaldo em conclusões científicas. A farmacologia moderna tem experimentado diversas comprovações de tal dito. Tem-se observado que substâncias capazes de desequilibrar um estado saudável, induzindo a um estado patológico, podem outrora atuar como restabelecedoras da homeostase.

Tal qual um jogo de forças em uma balança, se usada no momento certo e na quantidade adequada, substâncias originalmente consideradas tóxicas passam a manifestar efeitos terapêuticos que tendem a reconduzir a um equilíbrio. Por exemplo, um paciente hemofílico ou até mesmo uma pessoa sã (fazendo uso de antiinflamatórios) podem ser vítimas dos efeitos tóxicos do uso inadequado de substâncias com efeitos anticoagulantes. Por outro lado, pessoas com predisposição à formação de trombos podem certamente ser beneficiadas por tais efeitos, se utilizarem tais substâncias em proporções adequadas.

A biodiversidade brasileira propicia a valiosa oportunidade da exploração de moléculas farmacologicamente ativas e possibilita o acesso a soluções para patologias que somente a natureza, em seus bilhões de anos de evolução, foi capaz de desenhar.

No caso das serpentes, o tempo de evolução é aproximadamente 25 vezes maior que o humano, tendo surgido há aproximadamente 130 milhões de anos. Nesse período, espécies venenosas foram mantidas por seleção natural e evoluídas sucessivamente, desenvolvendo venenos que representam uma

mistura de componentes altamente bioativos. Relatos de concentrações letais para 50% dos animais testados (LD_{50}), estimadas em menos de $30\mu\text{g}/\text{Kg}$, encontram-se disponíveis na literatura (ROMANO-HOGE, 1990).

Nesse contexto, peçonhas de serpentes, frequentemente associados a envenenamentos dramáticos, podem ser úteis como arsenais terapêuticos, se adequadamente empregados.

Os trabalhos aqui descritos refletem a filosofia da utilização racional de produtos oriundos da biodiversidade como indicadores de alvos terapêuticos e como protótipos de fármacos. Para ser mais específico, os venenos de serpentes receberam atenção no presente caso. As toxinas viperídicas classificadas como desintegrinas, provenientes da serpente tipicamente brasileira, *Bothrops alternatus*, são enfocadas. Atenção especial foi dada a uma nova desintegrina RGD descoberta no decorrer desse projeto e que passou a ser chamada de DisBa-01. A clonagem de uma segunda desintegrina DisBa-02 foi brevemente descrita.

Nos tópicos a seguir serão abordados temas relevantes para a melhor compreensão do trabalho desenvolvido, bem como, as motivações para a sua execução.

1.1. ADESÃO E COMPORTAMENTO CELULAR

Muitos processos biológicos como a transdução de sinais, a diferenciação e migração celular, o desenvolvimento embrionário, a cicatrização de ferimentos, a resposta imunológica, a apoptose e a metástase, são fortemente modulados por processos adesivos que ocorrem, seja por interações entre células ou entre essas e a matriz extracelular (ECM) adjacente. Normalmente os processos adesivos

celulares inibem a apoptose, enquanto que o desligamento celular a induz (Figura 1, GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1999).

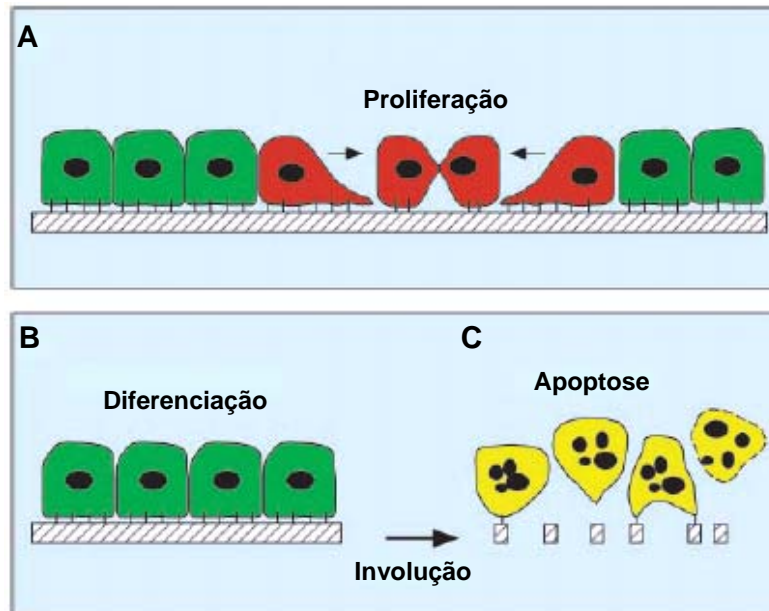


Figura 1: A adesão e o destino celular (Extraído de GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1999). **A)** Havendo espaço e adesão, as células tendem a proliferar. **B)** Havendo adesão e pouco espaço intercelular, as células tendem a se diferenciarem. **C)** Em caso de desadesão, células que possuem desenvolvimento dependente de fixação tendem a morrer em processos de apoptose.

Falhas no mecanismo apoptótico decorrente do desligamento celular são freqüentemente correlacionadas com processos de malignização (PARISE, LEE & JULIANO, 2000).

Entre as proteínas transmembranas envolvidas nos processos adesivos, podem-se citar as caderinas, as selectinas, alguns membros da superfamília das imunoglobulinas e as integrinas (revisado por ROJAS e AHMED, 2000).

As caderinas são funcionalmente dependentes de cálcio. Seus integrantes são expressos em tecidos específicos durante o desenvolvimento, relacionando-se com a morfogênese. Populações celulares expressando diferentes caderinas separam-se, enquanto aquelas que expressam mesma caderina agrupam-se

através de adesão homofílica (adesão mediada por moléculas idênticas). A caderina E é co-localizada com filamentos de actina e media a adesão de células epiteliais. Sua perda é correlacionada com a carcinogênese epitelial.

As selectinas possuem um domínio lectina dependente de cálcio que se liga especificamente a carboidratos de células adjacentes. Essas moléculas medeiam uma variedade de interações heterofílicas (adesão mediada por moléculas diferentes) entre leucócitos e células endoteliais, sendo particularmente importantes em processos inflamatórios e imunológicos.

Alguns membros da superfamília das imunoglobulinas relacionam-se com a adesão célula-célula através de interações homofílicas independentes de cálcio. Acredita-se que sejam especialmente importantes no desenvolvimento embrionário. ICAMs (*Intercellular Adhesion Molecules*) são um membro dessa família com importância na função imunológica. Essa proteína de superfície encontra-se superexpressa em células endoteliais ativadas e está envolvida em adesões heterofílicas com integrinas presentes em leucócitos. Outro importante membro dessa superfamília são as VCAMs (*Vascular Cell Adhesion Molecules*) que junto com ICAM participam do processo de adesão entre células do sangue e células tumorais às células endoteliais durante a invasão de um tecido.

As integrinas são glicoproteínas de membrana do tipo I, relacionadas com a adesão célula-célula e célula-ECM. Devido a sua relevância neste trabalho, as integrinas são descritas em separado nas próximas subseções (1.1.1 e 1.1.2).

1.1.1. Integrinas: Estrutura

As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas, resultantes da combinação entre subunidades α (120 à 180kDa) e β (90 à 110kDa) através de

ligação não covalente, formando um complexo com aproximadamente 280 Å de comprimento. Excetuando-se a porção intracelular da subunidade β_4 (1000 resíduos, SUZUKI e NAITOH, 1990), todos os demais domínios citoplasmáticos são considerados relativamente curtos (20-60 resíduos, HYNES, 2002; Humphries, 2000). A porção intracelular de subunidades β é capaz de ligar-se ao citoesqueleto de actina e proteínas sinalizadoras da adesão focal, diretamente ou através de proteínas adaptadoras (CAIRNS, KHOKHA e HILL, 2003; LAFLAMME e AUER, 1996). Essa ligação relaciona-se diretamente com a influência desses receptores no comportamento celular. Dentre as proteínas sinalizadoras frequentemente associadas a transdução de sinais incluem-se a FAK (*Focal Adhesion Kinase*), CAS (*Crk-associated substrate* ou p130Cas), SRC (*v-src sarcoma viral oncogene*), proteínas da família das MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*).

Nos últimos anos, as estruturas de integrinas têm sido sondadas por técnicas como microscopia eletrônica, espectroscopia por dicroísmo circular, espectroscopia por ressonância nuclear magnética (NMR), modelagem molecular e pela difração de raios X em cristais protéicos (HUMPHRIES, 2000). Contudo, somente recentemente foi possível a resolução da porção extracelular de uma integrina em seu estado dimérico (PDB: [1JV2](#); XIONG et al. 2001). Nesse trabalho foi apresentada pela primeira vez a resolução da estrutura tridimensional do domínio extracelular da integrina $\alpha V\beta_3$ (em sua conformação ativa), elucidada através de difração de raios X a partir de cristais dessa proteína (Figura 2). Uma vez que a presença da porção C-terminal da integrina (incluindo a porção que atravessa a membrana) geralmente a restringe a um estado de baixa afinidade (DANA, FATHALLAH e ARNAOUT, 2001; HUGHES et al., 1996), é possível que a conformação ativa encontrada no cristal seja decorrente de sua remoção.

A região N-terminal da subunidade αV possui a forma de enovelamento conhecido como β -propulsor (β -*propeller*, pela similaridade com propulsores de motores de barco) composta por sete lâminas com aproximadamente 60 resíduos cada (Figura 3: A). A sobreposição das lâminas do β -propulsor N-terminal (Figura 3: B) evidenciam o motivo único descrito abaixo.

$$(X_{17-33} - \{\phi\phi G\phi X_{13-20} P X_{2-15} G X_{5-8}\})_7$$

onde,

X: qualquer resíduo
 ϕ : resíduo aromático

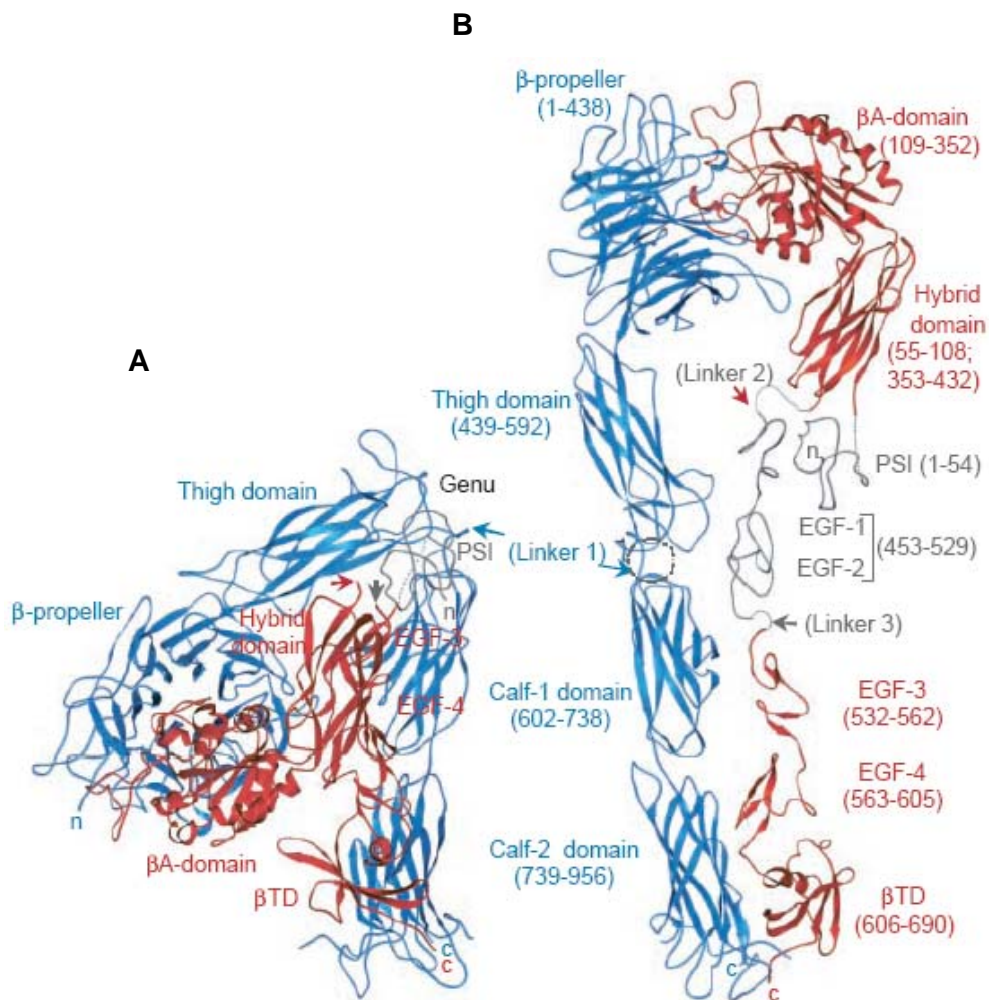


Figura 2: Estrutura da integrina $\alpha V\beta 3$. A subunidade αV é representada em azul e a subunidade $\beta 3$ em vermelho. **A)** Modelo em fitas da integrina conforme a resolução do cristal. **B)** Modelo gerado para a forma estendida da integrina (Extraído de XIONG, et al, 2001).

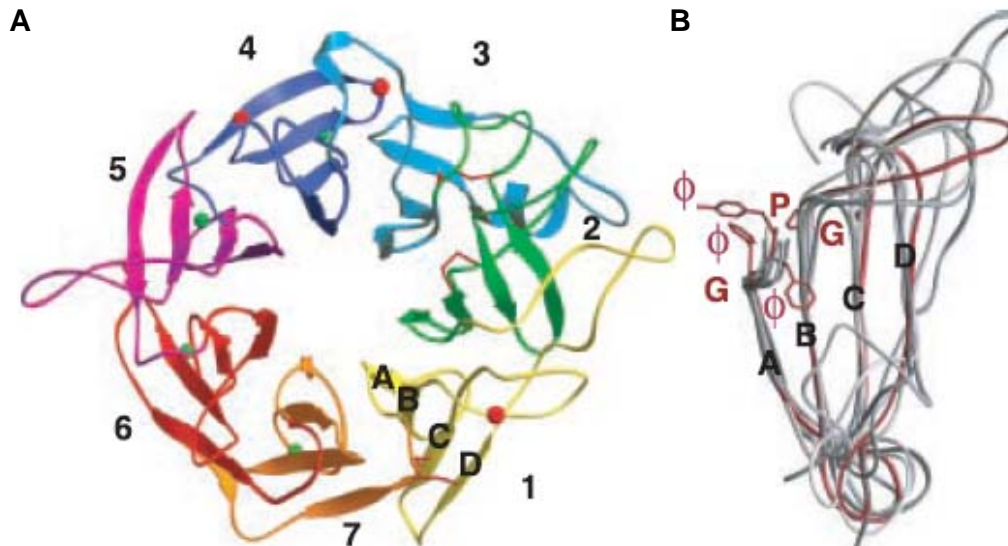


Figura 3: Estrutura do β -propulsor presente na subunidade αV . **A)** β -propulsor encontrado na subunidade αV . A posição dos carboidratos é representada por esferas vermelhas e átomos de metal por esferas verdes. Cada lâmina é representada em cor diferente. **B)** Sobreposição das sete lâminas que compõem o β -propulsor. A lâmina cinco e resíduos que interagem com a Arg²⁶¹ são representados em vermelho (Extraído de XIONG, et al, 2001).

A cauda dessa subunidade (αV) é composta por três módulos do enovelamento conhecido como sanduíche- β (β -sandwich; um do tipo “Ig-like tight domain” e dois “calf domains”), sendo que entre o primeiro e segundo módulo encontra-se uma região de alta flexibilidade (*genu*). Intrigantemente algumas integrinas, mas não a αV , possuem um domínio tipo A (encontrado no fator de von Willebrand) inserido no β -propulsor (denominado domínio α -A) que parece interagir com ligantes na formação de complexos (MICHISHITA, VIDEM e ARNAOUT, 1993).

Na subunidade $\beta 3$, o N-terminal constitui um domínio tipo A (β -A) composto de seis fitas que contém dois sítios de ligação de metal, MIDAS (**Metal Ion-Dependent Adhesion Site**) e ADMIDAS (**Adjacent to MIDAS**). Consecutivamente a partir do N-terminal, ainda são encontrados um domínio híbrido (Figura 2: B) e a

cauda C-terminal. Essa cauda é constituída por um domínio PSI (plexinas, semaforinas e integrinas), quatro domínios tipo EGF (*epithelial growth factor*) e um domínio tipo cauda β (*β -tail domain* ou enovelamento tipo-cistatina). A região correspondente aos domínios híbrido, PSI e dois domínios tipo EGF, inferem à subunidade $\beta 3$ a flexibilidade necessária para o encurvamento da integrina (Figura 2).

Os contatos entre as subunidades α e β envolvem primariamente suas porções N-terminais extracelulares (HUMPHRIES, 2000) na formação de uma “cabeça” globular (90 x 60 x 45 Å). A interação entre os domínios N-terminais, β -propulsor (subunidade αV) e β -A (subunidade $\beta 3$), é estabilizada por um resíduo de arginina (Arg²⁶¹) presente em uma pequena hélice do tipo 3_{10} e que se projeta para a cavidade do β -propulsor presente na subunidade αV (Figura 4: A e B). A fixação do resíduo Arg²⁶¹ ocorre pela interação com primeiro e o quarto resíduo do motivo encontrado nas lâminas desse domínio. Em todas as demais subunidades β (exceto pela $\beta 4$) esse resíduo de Arg é substituído por um resíduo de Lys. A superfície de contato entre o domínio β -propulsor (subunidade αV) e o domínio β -A (subunidade $\beta 3$) envolve uma área de aproximadamente 1600 Å.

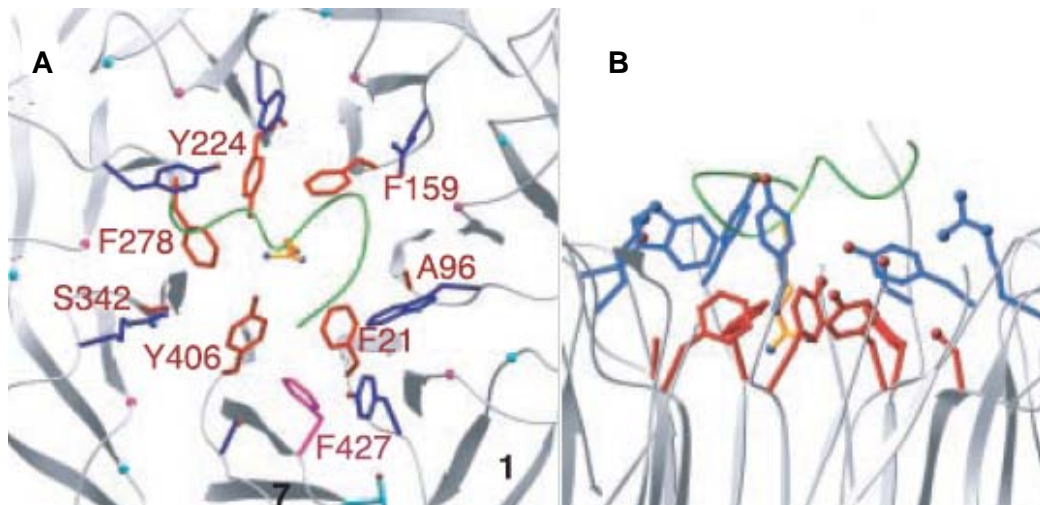


Figura 4: Interação entre os domínios β -propulsor (subunidade αV) e β -A (subunidade $\beta 3$). **A** e **B** São imagens da interação entre o β -propulsor da subunidade αV com o domínio β -A da subunidade $\beta 3$ evidenciando-se interações com a Arg²⁶¹, respectivamente, com visão de cima e de lado. A hélice 3_{10} que contém a Arg²⁶¹ é representada em verde (Extraído de XIONG, et al, 2001).

As porções restantes formam duas caudas em forma de bastão (**Figura 2: A e B**; ERB et al., 1997) que terminam por atravessar a membrana plasmática.

O aspecto da interação entre os domínios N-terminais das subunidades αV (β -propulsor) e $\beta 3$ (β -A) apresentam similaridades notáveis quando comparada com aquela encontrada, respectivamente, em subunidades β e α de proteínas G (**Figura 5**). Contudo, em proteínas G a subunidade β interage com a α através de uma hélice $\alpha 2$. Em ambos os casos, apenas seis lâminas do β -propulsor fazem parte da interface com a outra subunidade.

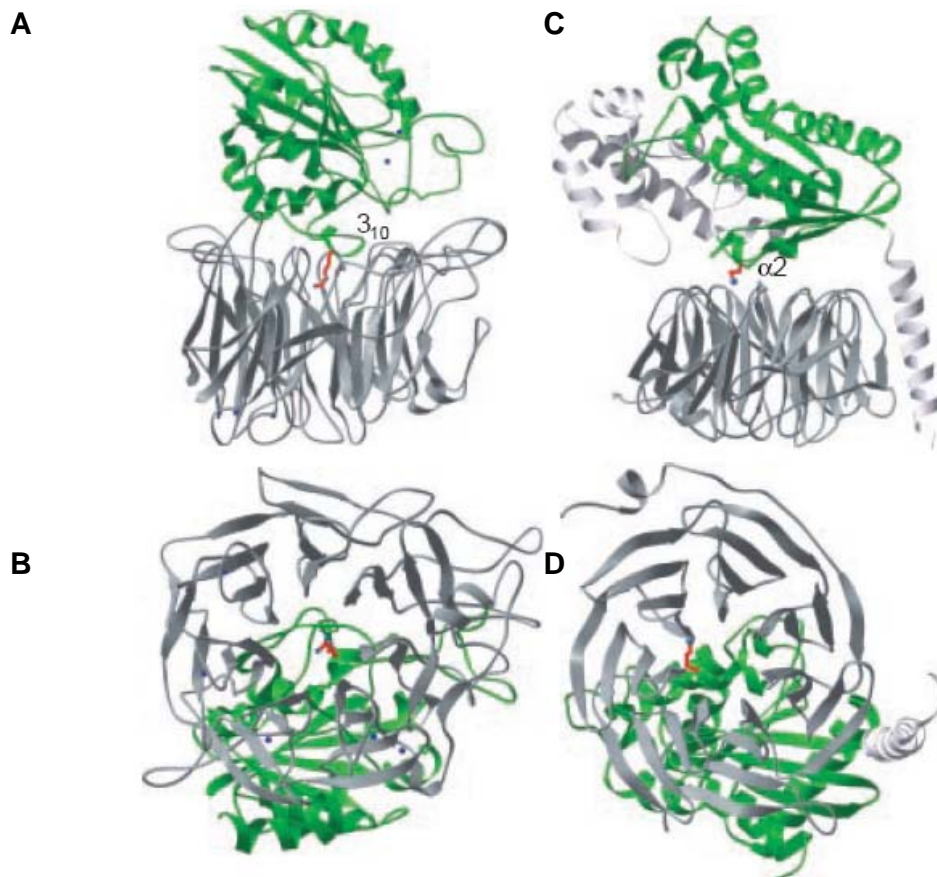


Figura 5: Similaridade do aspecto de interação entre β -propulsor/domínio β -A (integrina $\alpha V\beta 3$) e entre subunidades β/α (proteínas G). **A** e **B** representam aspectos da interação encontrada na integrina

$\alpha V\beta 3$. **C**) e **D**) representam aspectos da interação observada em proteínas G (Extraído de XIONG, et al, 2001). São representados em verde o domínio β -A e seu homólogo na subunidade β de proteínas G.

A comparação das estruturas da integrina $\alpha V\beta 3$ na ausência ou presença de um peptídeo RGD cíclico (XIONG *et al*, 2002) permitem constatar que a ligação de metais no MIDAS é dependente da presença do ligante. Outra observação oriunda dessas comparações é a existência de uma flexibilidade considerável do receptor ao se comparar ambas as estruturas, justificando a formação do epítopo conhecido como LIBS (*Ligand Induced Binding Site*) e a transdução de sinais (ver animação em www.sciencemag.org/cgi/content/full/1069040/DC1).

1.1.2. Integrinas: Função

As integrinas são amplamente distribuídas no reino animal, sendo observadas de esponjas a mamíferos (revisado por HUMPHRIES, 2000). Funcionalmente, são dependentes da ligação de cátions divalentes (Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++}) para a manifestação de suas atividades adesivas. Ao menos 18 subunidades α e 8 β já foram descritas (PARISE, LEE E JULIANO, 2000; CAIRNS, KHOKHA e HILL, 2003). A diversidade dessa família de proteínas é oriunda de combinações entre as diferentes subunidades α e β , assim, seus membros geralmente diferem quanto a suas gamas de ligantes, afinidades e atividades biológicas (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999). Até o momento foram descritas 24 combinações entre subunidades α e β . As associações entre integrinas e seus ligantes são freqüentemente promíscuas, de forma que uma integrina pode adotar vários ligantes e um ligante pode interagir com várias integrinas (**Tabela 1**).

O termo integrina, foi inicialmente utilizado referindo-se ao seu papel de intermediador na comunicação entre o citoesqueleto celular e proteínas plasmáticas ou da ECM (por exemplo: laminina, fibrinogênio, fibronectina,

colágeno, vitronectina, osteopontina, trombospondina e iC3b do sistema complemento, **Figura 6**). Contudo, essas proteínas de superfície celular também mediam a adesão célula-célula através de interações com outras proteínas de membrana como ICAM-1, 2 e 3, VCAM-1 e caderina E (**Tabela 1**).

Em integrinas que possuem o domínio A na subunidade α (α -A), esta subunidade é necessária e suficiente para a interação de ligantes fisiológicos (MICHISHITA, VIDEM e ARNAOUT, 1993). Já em integrinas que não possuem um domínio α -A, um domínio de mesmo tipo presente em todas as subunidades β (β -A) é requerido.

Tabela 1: Integrinas, seus ligantes endógenos e distribuição celular (CLEGG et al., 2003; DARRIBERE et al., 2000; JIN e VARNER, 2004; PETRUZZELLI, TAKAMI E HUMES, 1999).

SUBUNIDADES	LIGANTES ENDÓGENOS	DISTRIBUIÇÃO CELULAR	
		NÃO LEUCÓCITO	LEUCÓCITOS
α_1 (CD49a)	CO, LM	FB, MB	ActB, actT
α_2 (CD49b)	CO, LM, CA	PT, FB, ED, EP	ActT
α_3 (CD49c)	CO, LM, FN, ENT, TSP	EP, FB	
α_4 (CD49d)	FN, VCAM-1, ADAM-28, OP, TSP, VCAM, vWF	CN, FB	B, T, M, LGG
α_5 (CD49e)	FN, FG, ADAM-15, L1CAM, OP, TSP	FB, EP, ED, PT	TM, T
β_1 (CD29)	α_6 (CD49f) LM, MER, KAL, ADAM-2, ADAM-3, ADAM-9	PT	T
	α_7 (CD49g) LM	MC, EP	
	α_8 OP, VN, FN, NF, TN	EP, CN	
	α_9 TN, OP, VCAM, ADAM-12, ADAM-15, FXIII, CO, LM, TTG, vWF.	Amplamente distribuída	
	α_{10} CO	CO, FB, MC	
	α_{11} CO	MC	
	α_V (CD51) OP, VN, FN, L1CAM, TGF- β 1	FB	
	α_L (CD11a) ICAM-1, 2, 3, 4 e 5		B, T, M, G
β_2 (CD18)	α_M (CD11b) C3bi, FG, FX, ICAM-1, NIF		M, G
	α_X (CD11c) C3bi, FG		M, G
	α_D (CD11d) VCAM-1, ICAM-3		MMc
	α_{IIb} (CD41) FG, FN, vWF, VN, ICAM-1, TSP, CO, OP	PT, diversas células tumorais	
β_3 (CD61)	α_V (CD51) ADAM-15, ADAM-23, BSP, MMP-2, NF, CO, OP, VN, FN, FG, vWF, PT, TSP, TN, LM, PECAM-1, L1CAM, Thy-1	ED	
β_4 (CD104)	α_6 (CD49f) LM	CC	
β_5	α_V (CD51) ADAM-9, FN, VN, BSP, PT, TGF- β 1, OP	CC, FB, EP	
β_6	α_V (CD51) FN, NF, TN, TSP, TGF- β 1	CC, EP	
β_7	α_4 (CD49d) FN, Mad-CAM, VCAM-1, NF		LIE

	$\alpha_{E(CD103)}$ CAD-E	LIE
β_8	$\alpha_{V(CD51)}$ FN, VCAM-1, LM, CO, TGF- β 1	EP, AT

Ligantes ADAM: desintegrina e metaloprotease; BSP: Sialoproteína do osso; CA: Condroadarina; Cad-E: Caderina E; CO: Colágeno; ENT: Entactina; FG: Fibrinogênio; FN: Fibronectina; VCAM: Molécula de adesão de células vasculares; FX: fator X da coagulação; FXIII: fator XIII da coagulação; ICAM: molécula de adesão intercelular; KAL: Kalinina; L1CAM: Molécula de adesão de células L1 (CD31); LM: Laminina; MadCAM: molécula de adesão celular da mucosa; C3bi: proteína 3b inativada (sistema complemento); MER: Merosina; NF: Nefronectina; NIF: Fator inibidor de neutrófilos; OP: Osteopontina; PECAM-1: Molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais; PT: Protrombina; TGF- β 1: Fator β 1 de crescimento transformante; Thy-1: Antígeno 1 de célula do timo; TN: Tenascina; TSP: Trombospondina; TTG: Transglutaminase tecidual; VN: Vitronectina; vWF: Fator von Willebrand

Células actB: Células B ativadas; actT: Células T ativadas; AT: Astrócito; B: Células B; CC: Células de carcinoma; CN: Células derivadas da crista neuronal; CO: Condócitos ED: Células endoteliais; EP: Células epiteliais; FB: Fibroblasto; G: Granulócitos; LGG: Linfócitos granulares grandes; LIE: Linfócitos intraepiteliais; M: Monócitos; MB: Membrana basal; MC: Células musculares; MMc: Linhagens mielomonocíticas; PT: Plaquetas; T: Células T.

ND Não determinado.

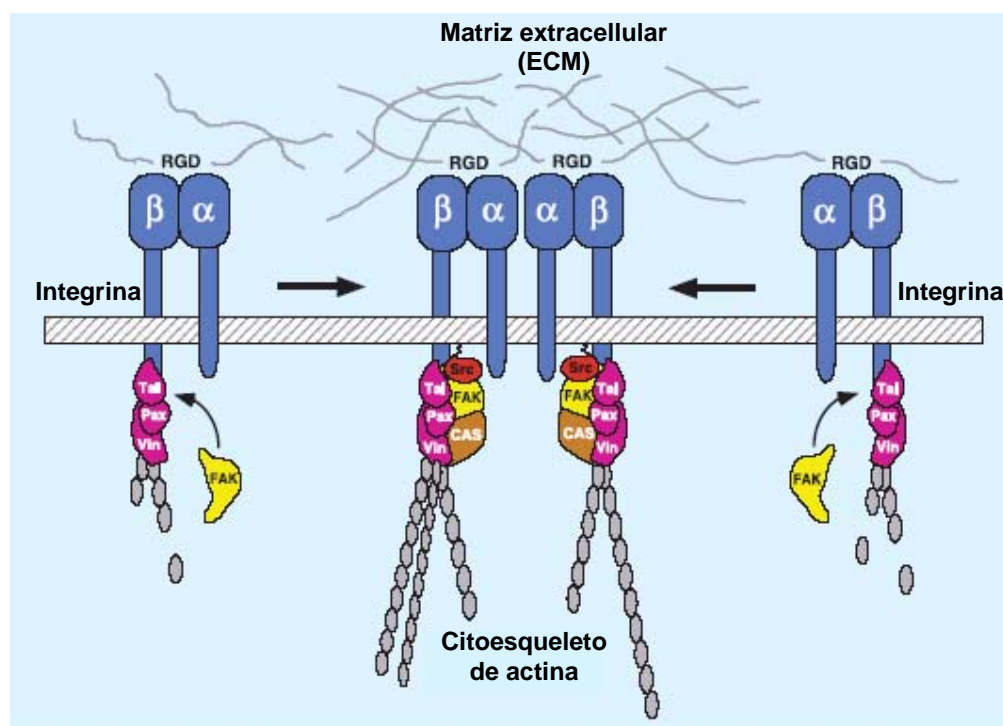


Figura 6: Integração do meio intra e extracelular através de integrinas. A ligação com a ECM promove o agrupamento (*clustering*) de integrinas e a associação com o citoesqueleto que, por sua vez, aumenta o agrupamento de integrinas e reorganização da ECM em um sistema de realimentação positiva (*positive feedback*). RGD: motivo de ligação Arg-Gly-Asp; Tal: talina; Pax: paxilina; Vin: vinculina; CAS: p130CAS, FAK: quinase de adesão focal (Extraído de GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1999).

Diversas integrinas incluindo a $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ e $\alpha_v\beta_6$ reconhecem a motivo Arg-Gly-Asp (RGD) em seus ligantes, enquanto que outras reconhecem seqüências alternativas (MIZEJEWSKI, 1999). Desintegrinas (Subseção: 1.3) portadoras desse motivo são frequentemente fortes inibidoras de algumas integrinas compostas por subunidades β_1 e β_3 como a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e a integrina $\alpha_v\beta_3$. O conhecimento dessas pequenas seqüências tem permitido o desenho de inibidores de integrinas que as mimetizam (revisado por CURLEY, BLUM e HUMPHRIES, 1999).

Se por um lado as integrinas são necessárias em uma série de processos fisiológicos, por outro, elas estão associadas a patologias como a neoplasia, a metástase, a disfunção imune, os danos em reperfusão isquêmica, as infecções virais, a osteoporose e a coagulopatia (ARNAOUT, 1990; HYNES, 1992). A integrina $\alpha_v\beta_3$ é receptora de alguns vírus, como o vírus da aftosa (*foot and mouth disease virus*), Adenovírus e HIV (*Human Immudefficiency Virus*), além de possuir papel relevante em processos inflamatórios e na reabsorção óssea (revisado por ELICEIRI E CHERESH, 1999; PLOW et al., 2000).

A expressão aumentada de algumas integrinas está diretamente relacionada com processos associados à agressividade do câncer como a migração celular e a angiogênese. É o caso da expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$ superexpressa em linhagens agressivas como variantes de MDA-MB-231 (tumor de mama, Pecheur et al., 2002) e B16F10 (melanoma, Kang et al., 2000). Juntamente com a integrina $\alpha_v\beta_5$, esses receptores mediam a migração celular de forma constitutiva e dependente de fatores de crescimento, respectivamente. Ambas as integrinas têm demonstrado ser relevantes durante angiogênese (ZHOU et al., 2000). A integrina $\alpha_5\beta_1$, principal receptor para a fibronectina, media a inibição

de apoptose através da eliminação da proteína β -amilóide (participante da patologia do mal de Alzheimer) e produção da proteína Bcl-2 (anti-apoptótica), sendo essencial para o crescimento celular e desenvolvimento de órgãos (MARCINKIEWICS et al., 1999). Tanto o aumento quanto a diminuição na expressão de algumas integrinas podem correlacionar-se com processos de malignização (GRINSTEIN, ROTIN e MASON, 1989; INGBER et al., 1990).

Durante a retração de células endoteliais induzida pela ligação de células tumorais ou durante lesão de células endoteliais, as células tumorais aderem-se a ECM adjacente preferencialmente através de suas integrinas (ABECASSIS et al., 1987; KRAMER, GONZALEZ e NICOLSON, 1980) e plaquetas podem favorecer esse processo (MENTER et al., 1987).

Ao se associarem a ligantes endógenos ou não, as integrinas podem atuar como transdutoras de sinais do meio extracelular para o meio intracelular (sinalização tipo “*Outside-in*”). Contudo, o caminho inverso também é possível, onde a interação com componentes intracelulares pode modular a afinidade desses receptores por seus ligantes (sinalização tipo “*Inside-out*”). Recentemente foi demonstrado que eventos iniciados por receptores não-integrina podem alterar a conformação da cauda citoplasmática de integrinas convertendo-as a um estado de alta afinidade (KIM, CARMAN e SPRINGER, 2003). Dessa maneira, constitui-se uma sinalização bidirecional entre o ambiente extra e intracelular (COPPOLINO e DEDHAR, 2000).

Os eventos decorrentes da transdução de sinais a partir de integrinas são complexos e, até o momento, não foram completamente elucidados.

As cascatas de sinalizações passíveis de serem disparadas por integrinas podem ser moduladas também por proteínas de membrana como receptores de

fatores de crescimento (revisado por ELICEIRI, 2001 e ROSS, 2004), receptores de sobrevivência (HANAHAH e WEINBERG, 2000), receptores que se ligam à região constante de imunoglobulinas (ORTIZ-STERN e ROSALES, 2003), sindecanas (incluindo CD138), proteínas transmembrânicas de 4 passos (TM4SF, WOODS e COUCHMAN, 2000), receptor de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPAR, CD87; XUE et al. 1997) e pela proteína associada a integrina (IAP, CD47; LINDBERG et al., 1996).

Foi constatado que, em alguns casos, as sinalizações por integrinas convergem em vias originalmente descritas para outros receptores (**Figura 7**). Visto que as integrinas não possuem atividade enzimática, algumas proteínas de membrana supracitadas possivelmente atuam como co-receptores. Contudo, integrinas também recrutam proteínas sinalizadoras citoplasmáticas.

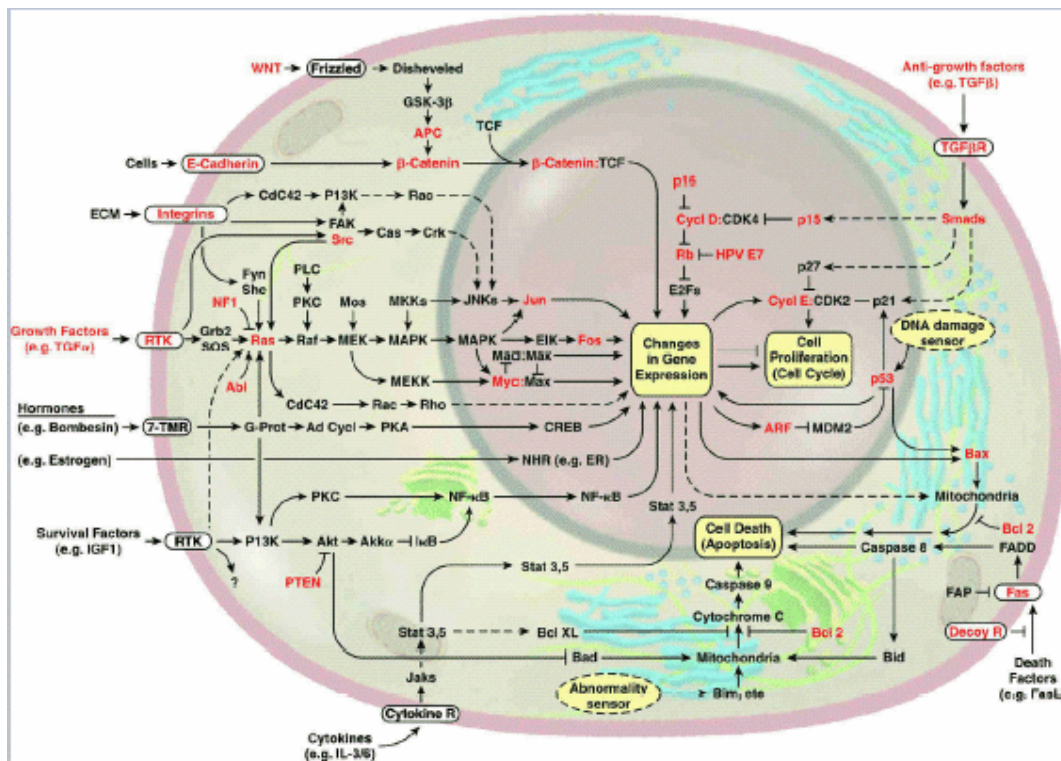


Figura 7: Sinalização por integrinas e inter-relação com outras vias sinalizadoras (Extraído de HANAHAH e WEINBERG, 2000).

As sindecanas ilustram as relações de proteínas transmembrânicas como moduladoras de integrinas. Diversos trabalhos têm revelado a importância desses receptores na transdução de sinais integrina dependentes (revisado por Beauvais e Rapraeger, 2004; COUCHMAN e WOODS, 1999; WOODS e COUCHMAN, 1998). Beauvais, Burbach e Rapraeger (2004), descrevem a dependência de sindecana-1 para a ativação da integrina $\alpha V\beta 3$ em células MDA-MB-231 e MDA-MB-435.

Outra molécula que se correlaciona com a modulação de integrinas é a enzima ciclooxigenase (COX-2) (RUEGG, DORMOND e MARIOTTI, 2004). Normalmente a COX-2 é pouco expressa em tecidos normais (DUBOIS et al., 1998) e altamente expressa em tumores (EBERHART et al., 1994), correlacionando-se com um aumento na expressão de prostaglandina E_2 (PGE_2) e na angiogênese (LIU et al., 2001; MULLER-DECKER et al., 2002).

Além da comunicação com vias sinalizadoras inicialmente descritas para outros receptores, as integrinas também se comunicam entre si. O fenômeno de trans-dominância, uma forma de comunicação entre integrinas, foi descrito como um processo onde a atividade de uma integrina (transdutora) inibe a atividade de outra integrina (alvo) (BLYSTONE et al., 1999). Um esquema de relações de comunicações entre integrinas baseado em uma breve revisão da literatura pode ser observado abaixo (**Figura 8**).

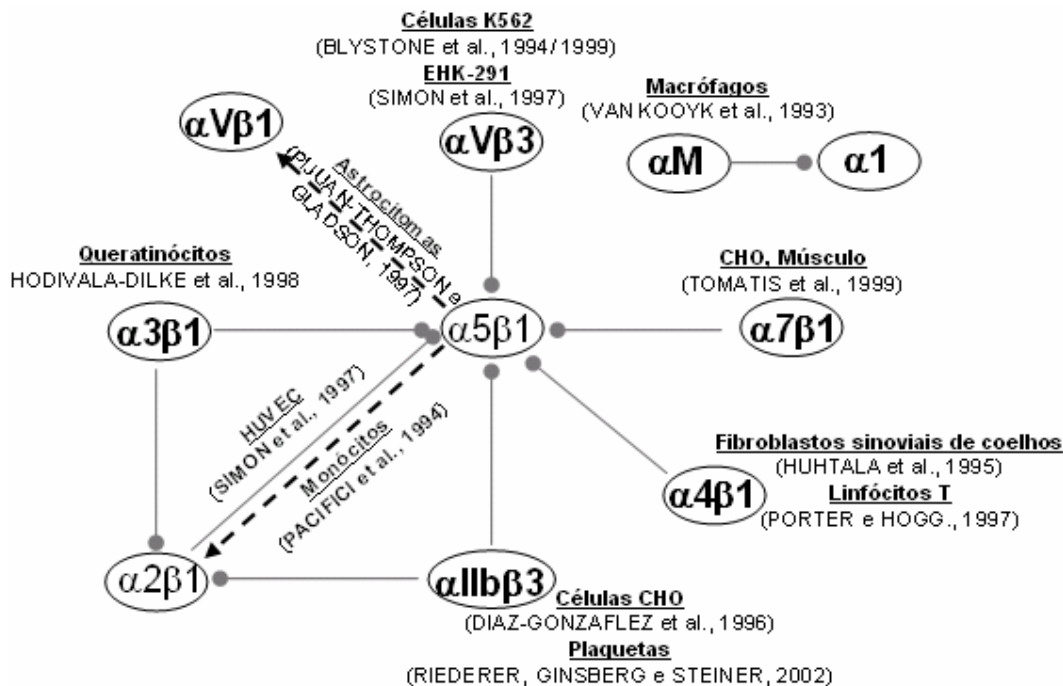


Figura 8: Comunicação entre integrinas e trans-dominância. A inibição de integrinas (trans-dominância) é representada por linhas cinza contendo um círculo preenchido na extremidade. A estimulação é representada por uma linha preta tracejada contendo uma seta na extremidade.

Entre as funções de integrinas afetadas por trans-dominância pode-se citar a fagocitose (BLYSTONE et al., 1994; BLYSTONE et al., 1995; GRESHAM et al., 1989), a interação com ligantes solúveis (CHEN et al., 1994, PACIFICI et al., 1994), a adesão (DIAZ-GONZALEZ et al., 1996; PORTER e HOGG, 1997; van KOOYK, 1993), a migração (BILATO et al., 1997; PORTER e HOGG, 1997; SIMON et al., 1997), a expressão gênica (HUHTALA et al., 1995) e a endocitose mediada por receptor (PIJUAN-THOMPSON e GLADSON, 1997).

Aparentemente, a cauda citoplasmática da subunidade β da integrina transdutora é necessária e suficiente para a manifestação do fenômeno de trans-dominância (BLYSTONE et al., 1995).

1.2. TUMORIGÊNESE E EVENTOS RELACIONADOS

Entre 131 e 201 o médico romano, Galeno, utilizou a palavra grega, Karkinos (que significa caranguejo), para designar o câncer. A palavra do latim, câncer, data do fim do século XV. Esta extrapolação pode ser justificada pelo aspecto do tumor, que apresenta um corpo central de onde irradiam vasos e outras ramificações.

http://www.billcasselman.com/dictionary_of_medical_derivations/dmd_four.htm

O câncer é resultado do desenvolvimento não controlado de um ou mais clones celulares que escapam das regras de homeostasia que regem a proliferação celular em tecidos normais e dos mecanismos que mantêm tais células normalmente diferenciadas (WEINBERG, 1989).

O estroma, ou microambiente de um foco tumoral, é caracterizado pela presença de células com diferenciações diversificadas (da normal àquelas aberrantes), de uma ECM e de elementos extracelulares. As interações entre células tumorais e os demais componentes do estroma são relevantes para o desenvolvimento do estado cancerígeno (CHANG e WERB, 2001). Diversos tipos celulares incluindo células endoteliais, inflamatórias, fibroblastos e macrófagos podem cooperar para o estabelecimento do tumor (CHANG e WERB, 2001; CROWTHER et al., 2001; TUXHORN et al., 2002).

Diferente dos tumores benignos, tumores malignos possuem características de transformação (pleiomorfismo - diferenças de tamanho e forma de células ou dos núcleos) como a alteração na relação entre o tamanho do núcleo e o tamanho da célula. Também são aumentadas as tendências de invasão, destruição de tecidos adjacentes e de disseminação através de vasos linfáticos ou sanguíneos, gerando focos distantes daqueles inicialmente concebidos. Essa disseminação, pelo processo de metástase, pode levar a destruição de órgãos vitais. De fato é mais freqüente a morte de pacientes não

em decorrência de tumores primários, mas, sim de metástases e suas propagações (FIDLER, 1990).

Destacam-se as seguintes etapas no processo metastático: i. *intravasamento* – invasão de sistema circulatório por células tumorais; ii. *ancoragem* em tecidos-alvos; iii. *extravasamento* – invasão de um novo tecido pela célula ancorada; iv. *crescimento* do novo foco tumoral.

1.2.1. Intravasamento

O intravasamento compreende a degradação da ECM, da mobilidade da célula neoplásica e da degradação da membrana basal endotelial. A degradação de componentes que constituem a barreira até a corrente circulatória é promovida principalmente por heparanases (NAKAJIMA et al., 1987; NAKAJIMA et al., 1990), tripsina (KOIVUNEN et al., 1991; REICH et al., 1988), catepsinas (QIAN et al., 1989; ROZHIN et al., 1990) e metaloproteases de matriz (MMPs; RUOSLAHTI e YAMAGUCHI, 1991; EDWARDS et al., 1987). A expressão de ativadores de plasminogênio também é tida como fator que exacerba a degradação, uma vez que a plasmina leva a degradação de proteínas da ECM (como a lamina e fibronectina) e pode ativar metaloproteases (MPs; DANO et al, 1985; SCHLECHTE, MURANO e BOYD, 1989; WERB et al., 1986). Concomitantemente, a degradação da ECM é dificultada por inibidores tissulares de metaloproteases (TIMPs) e inibidores de ativadores de plasminogênio (PAI-1 e PAI-2). Dessa forma, o nível de degradação é resultado de um balanço entre enzimas da degradação e seus inibidores.

Uma quantidade considerável de células tumorais pode chegar a atingir a circulação. Estima-se que para cada grama de tumor, 10^6 células atinjam a circulação a cada dia (CHANG et al. 2000; LIOTTA, KLEINERMAN e SAIDEL, 1974).

Contudo, o ambiente circulatório é bastante hostil às células de origem não hematogênica. Estima-se que dentre 10^3 a 10^6 células apenas uma sobreviva (ZETTER, 1990). Forças mecânicas como a pressão sanguínea e a contração de vasos, podem ser as principais causas de destruição de células tumorais na circulação (WEISS, ORR e HONN, 1989). O sistema imunológico, em especial os leucócitos, também participa como barreira adicional a processos metastáticos (FOO, 2002).

A agregação homotípica (FIDLER e BUCANA, 1977) ou heterotípica (pela combinação com plaquetas, linfócitos ou mesmo proteínas circulantes no plasma) de células tumorais constitui uma forma de proteção contra a destruição na corrente sanguínea e é considerado, portanto, como um evento relevante para a ocorrência de metástases (FOO, 2002). Um trabalho recente demonstra a interação entre células tumorais e neutrófilos intermediada pela integrina $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1 ou CD11b/CD18) de neutrófilos e ICAM-1 de células tumorais (SLATTERY e DONG, 2003).

1.2.2. Ancoragem e extravasamento

A ancoragem de células metastáticas em vasos de tecidos distantes pode ocorrer por processos mecânicos ou moleculares.

O processo mecânico pode ser explicado pelo aprisionamento de células tumorais determinado pela relação entre o diâmetro de microcapilares (entre 3 e 8 μm de diâmetro, POTTER e GROOM, 1983) e o de células tumorais isoladas ($> 20\mu\text{m}$) ou de seus agregados (CHAMBERS, GROOM e MACDONALD, 2002). A formação de agregados envolvendo plaquetas e células tumorais é especialmente relevante. Em 1865, foi estabelecida pela primeira vez a associação entre o câncer e a

trombose (LEVINE, LEE, e KAKKAR, 2003). Mais de 15% dos pacientes com câncer exibem tromboembolismo venoso e representam mais de 20% dos pacientes atendidos com trombose venosa profunda e embolia pulmonar (CAINE et al., 2003).

Esta hipercoagulabilidade pode ter diversas origens:

i. ativação da coagulação por células tumorais ou do sistema imunológico.

Em mais de 90% dos pacientes com câncer que exibem disfunções de coagulação. O evento é acompanhado em um aumento dos fatores de coagulação, produtos de degradação do fibrinogênio e fibrina e por trombocitose. Em outros casos, também foi descrita uma diminuição de fatores antitrombóticos (Antitrombina III, a proteína C e proteína S livre) ou aumento de fatores trombóticos (PAI-I) no sangue (RICKLES, LEVINE e EDWARDS, 1992).

ii. atividade procoagulante intrínseca das células tumorais e a inibição das propriedades anticoagulantes de células endoteliais, plaquetas e monócitos.

iii. os próprios tratamentos do câncer, como a quimioterapia e cirurgias, podem aumentar a tendência à trombose (LEE, 2002). Pacientes com câncer, submetidos a procedimentos cirúrgicos tem predisposição duas vezes maior que pacientes não acometidos pelo câncer quanto à ocorrência de complicações relacionadas ao tromboembolismo pós-operatório (GEERTS et al., 2001; KAKKAR e WILLIAMSON, 1999).

Uma vez estacionadas nas proximidades de células endoteliais, as células tumorais podem se ligar diretamente a células endoteliais através de diversas moléculas de adesão (Tabela 2).

Tabela 2: Moléculas de adesão em células endoteliais associadas a interações com células tumorais.

	Moléculas de adesão nas células endoteliais	Moléculas de adesão em células tumorais	Tipo celular	Referências
E-Selectinas	E-selectina	sLe ^a	Carcinomas de colo	LAFRENIE et al., 1994; TOZAWA et al., 1995
		sLe ^x	Carcinoma do rim	STEINBACH et al., 1996
	CEA	CEA	Carcinoma do seio Carcinomas de colo	MAJURI et al., 1994
Superfamília das imunoglobulinas	ICAM-1	β2	Glioma C6	TAMAKI et al., 199
	VCAM-1	α4	Carcinoma do rim	LAFRENIE et al., 1994 TOMITA et al., 1995
		α4β1	Melanomas Sarcomas	GAROFALO et al., 1995 PAAVONEN et al., 1994 WOJTUKIEWICZ et al., 1993
	α6	α6β1	Melanoma B16/129	RUIZ et al., 1993
Integrinas			Carcinoma de pequenas células	SHESKI et al. 1999
	αvβ3	?	Vários tipos de tumores	LAFRENIE et al., 1994
Outras moléculas de adesão	TSP	TSP e receptores	Câncer de mama	INCARDONA et al., 1995
	Heparan sulfato	TSP NCAM		ZOCCHI et al., 1993

CEA: antígeno carcembriônico (*Carciembryonic Antigen*); ICAM: molécula de adesão intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule*); NCAM: molécula de adesão de células neurais (*Neural Cell Adhesion Molecule*); TSP: trombospondina; sLe: sialil Lewis (*sialyl Lewis*); VCAM: molécula de adesão de célula vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule*). Modificado de ORR et al., 2000.

Algumas inter-relações entre células tumorais e células do sangue que favorecem estados de hipercoagulabilidade são esquematizadas abaixo (**Figura 9**).

A expressão de certos fatores em tecidos-alvos, como moléculas adesão na superfície de células endoteliais, a liberação de fatores quimiotáticos (MULLER et al., 2001) e a expressão de fatores de crescimento, também podem estimular a ancoragem seletiva de células tumorais.

O extravasamento da célula tumoral em um tecido-alvo conta com mecanismos similares aos descritos na etapa de intravasamento, porém, agora no sentido contrário.

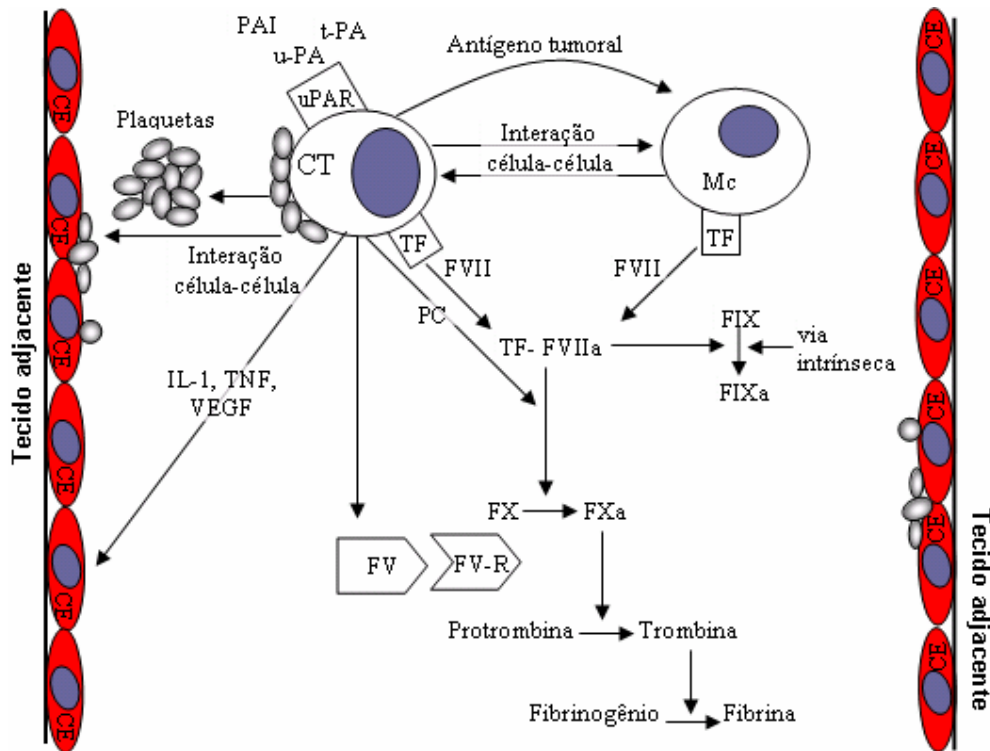


Figura 9: Principais vias de interação de células tumorais com o sistema hemostático. CT: célula tumoral, CE: Célula endotelial, Mc: Monócito, TF: fator tissular (glicoproteína transmembrânica de 47kDa), PC: fator pró-coagulantes (cisteino protetase de 68kDa), FV-R = receptor do fator V, u-PA: ativador de plasminogênio tipo uroquinase, t-PA = ativador tissular de plasminogênio, PAI: inibidor de ativadores de plasminogênio, uPAR: receptor de ativador de plasminogênio tipo uroquinase, IL-1: interleucina 1 β , TNF: Fator de necrose tumoral α , VEGF: fator de crescimento endotelial e vascular. As CT expressam fatores pró-coagulantes (TF, PC, FV-R) que ativam a cascata de coagulação e citocinas (IL-1, TNF e VEGF) que convertem o endotélio fisiológico em endotélio protrombótico. As células tumorais interagem com outras células do sistema hemostático diretamente (proteínas de adesão) ou através de mediadores solúveis. É freqüente a observação da interação entre células tumorais e plaquetas através de fibrinogênio, que serve de elo entre as integrinas das células envolvidas. O TF forma complexos com o FVII e FVII ativado, o qual por sua vez, ativa os fatores FIX e FX da coagulação (ANDOH et al., 1987; NEMERSON, 1992). O PC ativa o fator X independentemente de FVII (MIELICKI e GORDON, 1993). Moléculas de adesão em células endoteliais, como a VCAM-1, podem propiciar a interação direta com integrinas tumorais através da integrina α 4 β 1. A interação indireta pode ser estabelecida utilizando proteínas plasmáticas (Ex. von Willebrand factor e fibrinogênio) como ponte entre integrinas presentes em células endoteliais e tumorais. Adaptado de FALANGA e RICKLES, 1999.

1.2.3. Crescimento tumoral

O crescimento de um foco tumoral implantado depende intimamente de sua relação com as células presentes no estroma e vizinhanças. A expressão de moléculas de adesão (principalmente integrinas) pode modular a expressão de

diversos fatores de crescimento e citocinas incluindo TGF- β , TNF α , IL-1 e IL-6 (HONN e TANG, 1992).

Tanto o foco tumoral primário como focos tumorais derivados necessitam de vascularização para a troca de gases, nutrientes e remoção de resíduos metabólicos tóxicos.

As células tumorais podem ter sua proliferação estimulada pela liberação de fatores autócrinos (oriundos da própria célula) ou parácrinos (oriundos de outras células) (FOLKMAN, 1995). Células tumorais podem, por exemplo, secretar fatores de crescimento para células endoteliais incluindo bFGF (Fator básico de crescimento de fibroblastos) e VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) em resposta a diversos estímulos (FRELIN e LADOUX, 1997). O inverso também é verdadeiro, ou seja, células endoteliais e fibroblastos também podem secretar fatores de crescimento que terminam por desencadear seus efeitos em células tumorais.

1.2.4. Angiogênese fisiológica e tumoral

A formação de novos vasos durante a embriogênese é conhecida vasculogênese. A angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir daqueles pré-existentes e que ocorre em diversas patologias, mas, apenas em limitados processos fisiológicos assim como o desenvolvimento do corpo-lúteo durante a ovulação e a cicatrização. Excluindo-se as exceções citadas, vasos sanguíneos em adultos são normalmente quiescentes.

As células endoteliais estão entre as células com menor taxa de divisão no organismo. Seus tempos de renovação podem exceder 1000 dias, contudo em

estado de ativação angiogênica (*angiogenic switch*) essa renovação é reduzida a poucos dias (DENEKAMP, 1993).

O processo de angiogênese envolve a ativação de células endoteliais (pelo aumento de fatores pró-angiogênicos secretados por fibroblastos e células inflamatórias como macrófagos e mastócitos), degradação proteolítica da membrana basal endotelial, migração e proliferação de células endoteliais no estroma adjacente. Em seguida, a diferenciação e maturação das células endoteliais, formação de tubos, recrutamento de pericitos e a coalescência dos tubos completam o processo de formação de vasos sanguíneos (**Figura 10**).

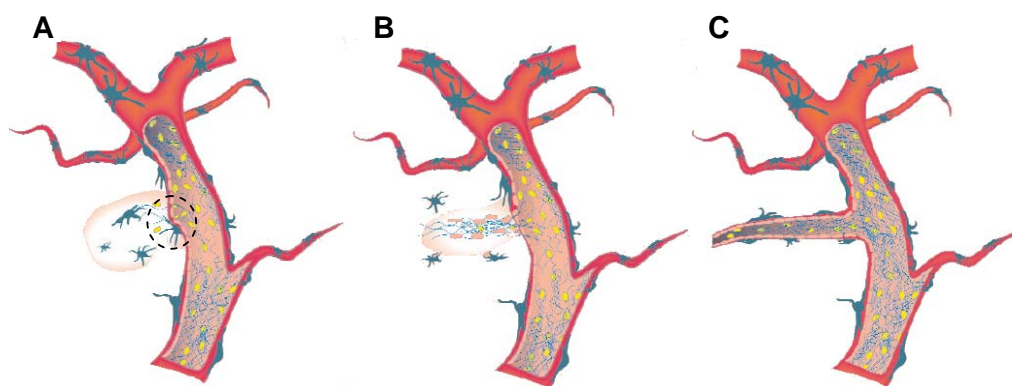


Figura 10. Angiogênese fisiológica. **A)** Inicialmente pericitos são desaderidos (células azuis) da parede vascular com a degradação da membrana basal endotelial (vermelho) e ECM (fundo branco). Segue-se a perda de ligações entre células endoteliais e destas com ECM, formação de saliência vascular localizada (círculo pontilhado) e a ligação de células endoteliais a proteínas plasmáticas (linhas azuis) como o fibrinogênio/fibrina no espaço extravascular. **B)** A perda de adesão celular e o estresse mecânico na região da saliência vascular induzem a migração de células endoteliais na matriz provisória (linhas azuis) em sentido a fatores quimiotáticos e proliferação celular. **C)** As células endoteliais formam junções célula-célula e tubos. Uma membrana basal vascular é depositada e pericitos são recrutados para completar a maturação de vasos neo-formados. Extraído e modificado de RUNDHAUG, 2005.

Em processos tumorais, a ativação de células endoteliais é também decorrente da produção de fatores angiogênicos por células tumorais. A angiogênese em tumores é de fundamental importância para o crescimento da massa tumoral e para a ocorrência de metástases. Sem a angiogênese, os focos tumorais ficam confinados em volumes de poucos milímetros de diâmetros e a

estimulação recíproca entre células tumorais e endoteliais é um evento-chave para o desenvolvimento cancerígeno (FOLKMAN, 1985).

A hipóxia gerada pela proliferação de células tumorais sem a suficiente contrapartida da angiogênese é uma situação constante em processos cancerígenos. Respostas tumorais a hipóxia envolvem a ativação da via das MAP (*Mitogen Activating Proteins*) e expressão do fator de transcrição Hif-1 (*Hypoxia inducible factor 1*, um ativador da expressão de VEGF) que juntamente com mutações na p53 tornam células tumorais mais resistentes tanto a hipóxia quanto a abordagens terapêuticas como a radioterapia e quimioterapia (KUNZ e IBRAHIM, 2003; ROYDES et al., 1998).

Uma particularidade dos vasos neoformados durante a angiogênese tumoral em relação aos vasos pré-estabelecidos é que os primeiros são caracterizados por certa imaturidade (membrana basal mais fragmentada e maior espaçamento entre as células endoteliais), facilitando o intravasamento e extravasamento de moléculas e células (NAGY et al. 1989, RESTUCCI, VICO e MAIOLINO, 2000).

1.3. DESINTEGRINAS

Em 1990 o termo **desintegrina** foi utilizado pela primeira vez para designar um grupo de polipeptídios (49-84 aminoácidos) não enzimáticos com pequena massa molecular (5-9kDa), ricos em cisteínas, derivados dos venenos de serpentes e que compartilham numerosas propriedades estruturais e funcionais.

1.3.1. Origem e classificação

O conjunto das desintegrinas descobertas revela seqüências com alta densidade de cisteínas (GOULD et al., 1990; MCLANE et al., 1998). A maioria das desintegrinas parece ser compatível com a hipótese que suas formas livres são liberadas de precursores maiores que contêm um domínio metaloproteolítico. Tais precursores conhecidos como metaloproteases de veneno de serpente (SVMPs, ***Snake Venom Metalloproteases***) podem ser agrupados em quatro classes (P-I à P-IV) de acordo com o número de domínios que apresentam (BJARNASON e FOX, 1994, **Figura 11A**).

Entretanto, recentemente, algumas evidências recentes, provenientes de análises de cDNA, sugerem uma origem alternativa. Em 2002, OKUDA et al. reportaram pela primeira vez que cadeias alfa das desintegrinas diméricas, acostatin (de *Agkistrodon contortrix contortrix*) e piscivostatina (de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*) são codificadas por precursores sem o domínio metaloproteolítico. Os cDNAs são constituídos apenas por um peptídeo sinal, aproximadamente 30 resíduos N-terminais do domínio metaloproteolítico e o domínio desintegrina. A análise em larga escala de cDNAs da glândula venenífera de *Bitis gabonica* (FRANCISCETTI et al., 2004) também resultou na descoberta de desintegrinas com codificação encurtada (*short coding disintegrins*), chamadas de gabonina-1 e gabonina-2, com a mesma organização de domínios. Estes dois relatos independentes de diferentes espécies suportam de maneira confiável a inclusão das desintegrinas com codificação encurtada como uma nova classe de precursores de desintegrinas (**Figura 11B**).

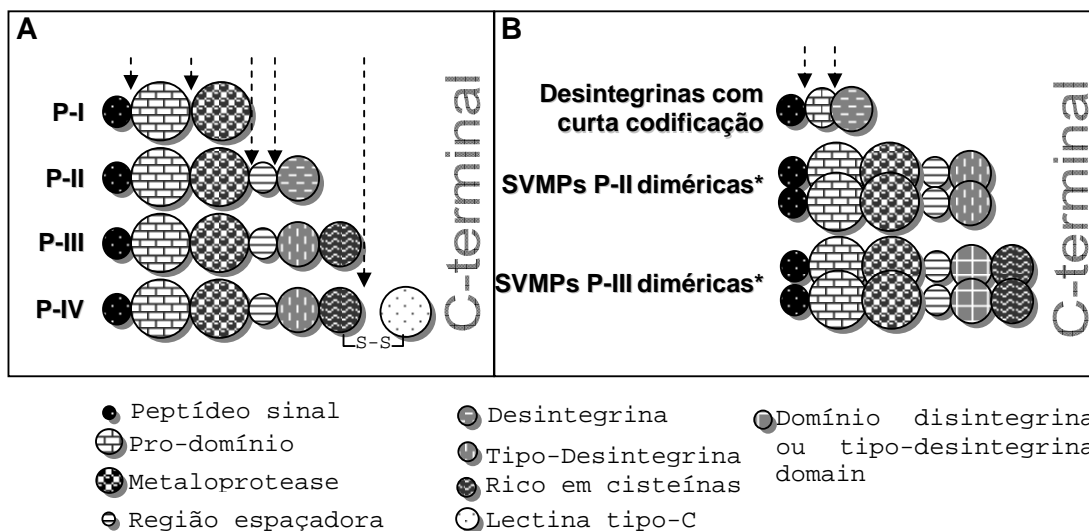


Figura 11: Precusores de metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) e desintegrinas. Pontos de processamento conhecidos entre domínios são indicados por setas pontilhadas. A) Classificação propondo uma origem comum para metaloproteases e desintegrinas a partir de precusores de maior massa molecular (BJARNASON e FOX, 1994). B) Precusores alternativos para moléculas diméricas sugerido por achados recentes (OKUDA et al., 2002; FRANCISCHETTI et al., 2004). *Baseado em relato isolado (respectivamente: NIKAI et al., 2000, COMINETTI et al., 2003).

Baseando-se em similaridades de seqüência, padrão de pontes de dissulfeto e relações evolucionárias, as desintegrinas podem ser classificadas em monoméricas (pequenas, médias, grandes) e diméricas (homo ou heterodiméricas). Os domínios tipo-desintegrina, que são expressos em fusão com o domínio rico em cisteínas de SVMPs de classe III, também possuem peculiaridades que sejam agrupadas em uma outra classe de desintegrinas (Tabela 3).

Dentro de cada grupo existe uma homologia evidente do padrão de pontes de dissulfeto. Análises desse padrão fornecem evidências interessantes, sugerindo uma evolução divergente a partir de um ancestral em comum, metaloprotease-desintegrina (MD), que perdeu subsequentemente pontes de dissulfeto. Calvete et al. (2003) sugeriram a seguinte seqüência evolucionária para as classes de desintegrinas: tipo-desintegrina >> desintegrinas grandes >>

desintegrinas médias >> desintegrinas diméricas. A origem de desintegrinas pequenas a partir de domínios tipo-desintegrina ou desintegrinas grandes deve ser investigada mais a fundo e dados de DNA, hoje indisponíveis para essa classe de proteínas, pode ajudar a esclarecer essa questão.

Tabela 3: Características de domínios desintegrina baseando-se em seqüência, padrão de pontes de dissulfeto e relações evolucionárias (GOULD et al., 1990, CALVETE et al., 2003).

Tipo	Cadeia	Classe	Resíduos	Pontes de dissulfeto	Distâncias evolucionárias*	Membros **
Desintegrina	Monomérica	Pequena	41-51	4	0.27	Echistatina, Eristostatina, Obtustatina, Ocellatusina
		Média	~ 70	6	0.14	Albolabrina, Barbourina, Elegantina, Flavoridina, Halisina, Kistrina, Salmosina 2, Triflavina
		Grande	~ 84	7	0.09	Bitistatina, Salmosina-3
Dimérica		Homodimérica	~	4 ic / 2 bc	0.41	CC8, Contortostatina, EC3, EC6, EMF10,
		Heterodimérica	67/cadeia			EO5, VB7, VLO4, VLO5
Tipo-desintegrina	Monomérica	-	~ 100	8	0.1	HR1A, Trimelissina-I, HF3, Botropasina, Jararagina, Catrocolastatina-C

ic: Pontes de dissulfeto intracadeia; bc: ponte de dissulfeto entre cadeias.

* Distância evolucionária mínima estimada pelo método de "neighbor joining" (calculadas a partir de CALVETE et al., 2003). Unidades arbitrárias inferidas por relógio evolutivo.

** Alguns membros representativos são citados.

1.3.2. Estrutura

Devido à diversidade de domínios desintegrina e tipo-desintegrina, as informações estruturais a respeito dessas moléculas ainda necessitam ser amplificadas. Nenhuma estrutura de desintegrina grande (~84 resíduos) ou de domínio tipo-desintegrina (~100 resíduos) foi elucidada até o momento. Até a conclusão da redação desta tese, seis estruturas de desintegrinas foram resolvidas por NMR e quatro por difração de raios X (Tabela 4).

Tabela 4: Domínios desintegrinas com estrutura resolvida.

Domínio	Descrição	Nome da molécula	PDB	Técnica	Referência
Desintegrina	Monomérica/RGD	Echistatina	2ECH	NMR	SAUDEK et al. 1991
	Monomérica/RGD	Flavoridina	1FVL	NMR	SENN e KLAUS, 1993
	Monomérica/RGD	Kistrina	1Q7J	NMR	ADLER et al., 1991
	Monomérica/RGD	Rodostomina	1JYP	NMR	GUO et al., 2001
	Monomérica/RGD	Salmosina	1L3X	NMR	SHIN et al. 2003
	Monomérica/não-RGD	Obtustatina	1MPZ	NMR	PAZ MORENO-MURCIANO, 2003
	Monomérica/RGD	Trimestatina	1J2L	XrC	FUJII et al. 2003
	Monomérica/não-RGD	-	1Z1X	XrC	HASSAN et al., à publicar
	Homodimérica/RGD	Schistatina	1RMR	XrC	BILGRAMI et al., 2004
	Heterodimérica/RGD em ambas as cadeias	-	1TEJ	XrC	BILGRAMI et al. 2005

XrC: Cristalografia associada à difração de raios X (*X-ray Crystallography*).

NMR: Ressonância nuclear magnética (*Nuclear Magnetic Resonance*).

Os primeiros estudos estruturais foram realizados por NMR e revelavam que o motivo RGD localiza-se na ponta de uma volta estrutural (*loop RGD*) protuberante. Esta volta e o C-terminal dessas toxinas exibem alto grau de mobilidade (ADLER et al., 1991, SAUDEK et al., 1991, SENN e Klaus, 1993, SMITH et al., 1996). A resolução da estrutura da trimestatina por cristalografia associada à difração de raios X revelou que esta molécula possui uma forma alongada (**Figura 12A**). Já a estrutura da salmosina resolvida por NMR constitui uma forma mais esférico-ovalada.

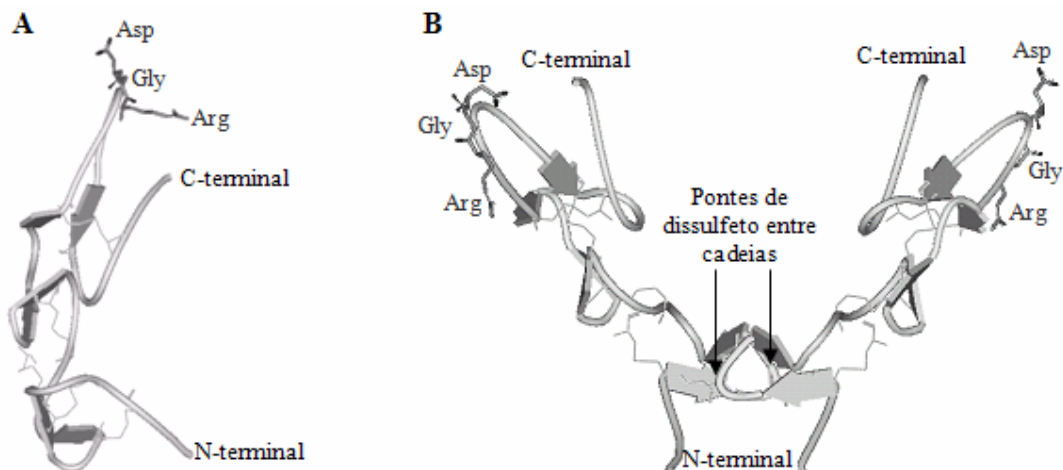


Figura 12: Estruturas de desintegrinas. Ambas as moléculas são esquematicamente representadas. Folhas β são representadas por setas cinza que apontam para a região C-terminal. Resíduos de cisteínas são representados em bastões. Os resíduos da seqüência RGD são representados em canudos e identificados pelo código de três letras. **A)** Trimestatina – desintegrina RGD monomérica (PDB: [1J2L](#)): A estrutura é composta de voltas β antiparalelas e pequenas folhas β antiparalelas. **B)** Desintegrina heterodimérica de *Echis carinatus* (PDB: [1TEJ](#)): Como a estrutura da desintegrina monomérica, é composta por voltas β e pequenas folhas β antiparalelas. Duas pontes de dissulfeto intracadeia são encontradas no N-terminal. O motivo RGD de cada cadeia aponta para direções opostas. Este arranjo especial pode ser compatível com a propriedade de agrupamento de integrinas por desintegrinas diméricas.

A estrutura formada é mantida coesa por seis pontes de dissulfeto, sendo que duas delas encontram-se estabilizando a volta que contém o motivo RGD. A estrutura secundária é composta por uma série de voltas β e por três pequenas folhas β antiparalelas. As cadeias laterais da arginina e do ácido aspártico, presentes no motivo RGD, apontam para direções opostas e o resíduo de glicina permite uma conformação única, escapando das restrições impostas pelas cadeias laterais vizinhas (FUJII et al., 2003).

A resolução estrutural da desintegrina RGD homodimérica, schistatina, trouxe nova e confiável informação sobre a formação de dímeros. Confirmando estudos prévios, envolvendo a determinação de pontes de dissulfeto de desintegrinas diméricas usando métodos químicos (MARCINKIEWICZ et al., 1999, CALVETE et al., 2003), este trabalho mostrou que o dímero possui quatro pontes de dissulfeto intracadeia (em cada cadeia) e duas pontes N-terminais entre as

cadeias. O contato N-terminal entre os monômeros também é estabilizado por interações hidrofóbicas e duas pontes de hidrogênio. As voltas que contêm o motivo RGD apontam para direções opostas, permitindo o agrupamento (*clustering*) de integrinas mediado por interações de uma desintegrina dimérica com duas integrinas. O C-terminal de ambas as cadeias foi resolvido em localização estruturalmente próxima às voltas RGD. A raiz média quadrada (RMS - *Root Mean Square*) dos desvios de posição de carbonos alfa (C- α) para a volta RGD, C-terminal e N-terminal do monômero da schistatina sobreposto a trimestatina (mais de 2,0 Å) fornece evidência de diferenças consideráveis entre essas moléculas. Outra diferença é relacionada à conformação de seus resíduos de ácido aspártico presentes no motivo RGD. Essas diferenças podem responder por suas diferenças na ligação com integrinas e atividades funcionais (BILGRAMI et al., 2004).

A estrutura de uma desintegrina heterodimérica, resolvida recentemente por Bilgrami et al. (2004, **Figura 12B**) exibe notáveis similaridades com a schistatina e o mesmo padrão de pontes de dissulfeto. A RMS de C- α calculada para 62 resíduos centrais de uma cadeia da schistatina comparada com a cadeia alfa ou beta da proteína heterodimérica é de aproximadamente 0.45 Å. Existem também diferenças visíveis na conformação das cadeias laterais presentes no motivo RGD, principalmente quando comparando as cadeias laterais dos resíduos de ácido aspártico.

Estudos de estrutura-função de desintegrinas têm demonstrado que as pontes de dissulfeto são essenciais para a ligação a integrinas, enquanto que os resíduos vizinhos do motivo RGD e C-terminal são relevantes para a afinidade e seleção de integrinas (WIERZBICKA-PATYNOWSKI et al., 1999, MCLANE et al., 2001,

YAHALOM et al., 2002). A cauda C-terminal das desintegrinas parece ainda induzir mudanças conformacionais em integrinas, expondo um epítipo conhecido como LIBS (MARCINKIEWICZ et al, 1997).

1.3.3. Efeitos biológicos

Depois de mais de duas décadas de pesquisas sobre desintegrinas, extensa literatura a respeito dos efeitos biológicos dessas moléculas foi acumulada. A inibição da agregação plaquetária, da angiogênese, de metástases e de crescimento tumoral por desintegrinas RGD, têm sido consistentemente confirmada por diversos trabalhos (revisões: NIEWIAROWSKI et al., 1994; MCLANE et al., 1998, 2004).

A evolução desenvolveu a engenharia de desintegrinas no sentido de gerar moléculas com alta afinidade e seletividade por integrinas. Frequentemente, baixas concentrações de desintegrinas são necessárias para a observação do efeito. A inibição da reabsorção óssea ($IC_{50}=0.1$ nM; FISHER et al., 1993), inibição da agregação plaquetária induzida por célula tumoral ($IC_{50}=3$ nM; CHIANG, SWAIM e HUANG, 1994) e a inibição da metástase tumorais ($IC_{50}=5$ nmols; BEVIGLIA, STEWART e NIEWIAROWSKI, 1995) são exemplos entusiásticos.

Dentre as atividades biológicas observadas, a inibição da agregação plaquetária possui íntima relação com os sintomas de envenenamento. A ligação de desintegrinas RGD com integrinas $\alpha IIb\beta 3$ de plaquetas bloqueia a última fase da agregação plaquetária e a formação de coágulos, independentemente do agonista em questão, contribuindo portanto para o estado hemorrágico encontrado no envenenamento por serpentes. Algumas desintegrinas parecem

ser capazes de se ligar a integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ inativadas de plaquetas enquanto outras requerem prévia ativação (CHUANG et al., 2003, OKUDA e MORITA, 2001, SWENSON et al., 2004).

Diversos estudos *in vitro* demonstraram que as desintegrinas são capazes de inibir a adesão de células tumorais a proteínas da ECM e membrana basal endotelial, competindo pela ligação com as integrinas (NIEWIAROWSKI *et al*, 1994; MCLANE *et al*, 1998; MARCINKIEWICS *et al*, 1999a/b; ZHOU *et al*, 2000). Também ficou demonstrada a eficácia da utilização de desintegrinas contra a agregação plaquetária induzida por células tumorais ou ADP (SHEU *et al*, 1993; BEVIGLIA, STWART E NIEWIAROSKI, 1995).

Estudos de sinalização têm apontado algumas desintegrinas como ativadoras de integrinas, disparando sinais intracelulares a partir da ligação, enquanto que outras funcionam como antagonistas típicos. Jarastatina (uma desintegrina RGD monomérica) aumenta o conteúdo de F-actina, induz quimiotaxia e bloqueia a quimiotaxia induzida por IL-8 ou fMLP em neutrófilos (COELHO et al., 1999). Este efeito é PI3K dependente e implica em um aumento na transcrição de IL8 e translocação de ERK2 para o núcleo, resultando em uma inibição da apoptose, provavelmente devido à sinalização disparadas pela ligação à integrina αM . Efeitos similares foram observados para a Alt-C, proteína portadora de domínio tipo-desintegrina e rico em cisteínas liberados por proteólise da alternagina, uma SVMP de classe P-III (SOUZA et al., 2000; MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003). EC3, uma desintegrina não RGD heterodimérica age como molécula apoptótica, provavelmente devido à ligação com a integrina $\alpha\text{9}\beta\text{1}$ (COELHO et al., 2004). Em células GD25, o efeito apoptótico da echistatina (uma pequena desintegrina RGD) corrobora com a atividade da EC3 no destino celular,

diminuindo a fosforilação de proteínas de sobrevivência (ALIMENTI et al., 2004). A contortostatina (CN, uma desintegrina homodimérica) e multisquamatina (uma desintegrina RGD pequena) inibem a fosforilação de FAK em plaquetas, mas somente a primeira pode disparar eventos de fosforilação de tirosina similares àqueles disparados pela ligação de fibrinogênio (CLARK et al., 1994). Em células tumorais, a CN aumenta quantidade de FAK e CAS fosforiladas por uma via integrina $\alpha V\beta 3$ /proteína SRC dependente (RITTER et al., 2000), enquanto que a echistatina e a flavoridina (uma desintegrina RGD média) não possuem tais efeitos (RITTER e MARKLAND, 2001). Foi sugerido que os efeitos diferenciais da CN ocorram devido a sua natureza dimérica que facilita o agrupamento de integrinas e a transdução de sinais.

Recentemente, as ligações de dois domínios tipo-desintegrinas/ricos em cisteína à integrinas $\alpha 2\beta 1$ revelaram achados interessantes. A Jararagina (uma SVMP de classe P-III) e Alt-C exibiram atividades que mimetizam a ligação do colágeno (ZIGRINO et al., 2002, COMINETTI et al., 2004) em fibroblastos. Alt-C induz aumento dramático na expressão de VEGF em fibroblastos e fosforilação de Akt/PKB em HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Nessas últimas, Alt-C aumenta a taxa de proliferação, portanto, atuando como um fator de sobrevivência. Apesar da relevância desses achados, toxinas atuando como fatores de sobrevivência não são esperados em venenos de serpentes. Como o sucesso do envenenamento para serpentes depende da velocidade dos efeitos e dado que a maioria dos efeitos danosos ocorrem em uma fase aguda, a conservação destes efeitos positivos (que ocorrem em médio e longo prazos) pode ser explicada pela baixa pressão seletiva. Além disso, outros componentes do veneno, assim como a CN (ZHOU et al., 1999) e salmosina (uma desintegrina

RGD monomérica, HONG et al., 2003) que induzem a apoptose de células endoteliais, poderiam sobrepor o efeito benéfico. No quadro de envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* são observados efeitos como a necrose, hemorragias locais e generalizadas, consumo de fatores da coagulação e nefrotoxicidade

Os efeitos de desintegrinas parecem ser bastante dependentes da manutenção de sua estrutura, uma vez que resultados indicam que a ruptura das pontes de dissulfeto abole a ligação a integrinas (MCLANE et al., 1998).

1.3.4. Aplicações

Moléculas de desintegrinas podem ser exploradas em terapêutica contra a osteoporose, trombose e câncer. De fato, algumas dessas toxinas têm sido investigadas no desenvolvimento farmacêutico. Echistatina e kistrina foram os protótipos de medicamentos que já estão em uso para a trombose e outras doenças cardiovasculares, respectivamente, Aggrastat (Merck®) e Ancrod (Knoll®). Moléculas que mimetizam peptídeos RGD encontram-se em desenvolvimento para o tratamento do câncer através da inibição da metástase e angiogênese tumoral (BROOKS et al., 1994, SHEU et al., 1997). Entretanto, as desintegrinas têm se mostrado frequentemente mais potentes que peptídeos RGD sintéticos na inibição de diversas integrinas (CHIANG, SWAIM e HUANG, 1994).

Recentemente, a estratégia de entrega da CN baseada em lipossomas provou que esta tecnologia pode aumentar a meia-vida de desintegrinas *in vivo* e suas concentrações em focos tumorais (SWENSON et al., 2004). Baseando-se no reconhecimento de integrinas específicas expressas em células tumorais, essas moléculas podem também ser usadas para entrega dirigida de fármacos e genes

(CHEN et al., 2005). Swenson et al. (2000) criaram uma fibrolase (metaloprotease fibrinolítica de *Agkistodon contortrix contortrix*) quimérica através da fusão dessa SVMP com um peptídeo tipo-RGD visando dirigir a enzima para a localização do trombo, combinando assim as atividades fibrinolítica e inibitória da agregação plaquetária. Adicionalmente, desintegrinas que podem disparar cascatas de sinalização por integrinas podem ser úteis no estudo das cascatas sinalizadoras desses receptores.

Finalmente, o aumento de informação estrutural certamente contribuirá para o processo de desenvolvimento farmacêutico. Seria de grande valia a resolução estrutural de complexos integrina-desintegrina que até o momento encontram-se indisponíveis. Tais informações seriam valiosas para o desenho racional de fármacos.

1.3.5. Relação com domínios desintegrina de mamíferos

ADAMs (**A Disintegrin And Metalloprotease**) são proteínas multimodulares expressas em mamíferos e que incluem um domínio homólogo a desintegrinas de venenos de serpentes. As ADAMs contêm um pró-domínio, um domínio metaloproteolítico, um domínio desintegrina, um domínio rico em Cys, um domínio com repetições do fator de crescimento epitelial (EGF), uma região transmembrânica e uma região citoplasmática (relacionada com a transdução de sinais). Contudo, também podem se apresentar na forma solúvel pela remoção das regiões transmembrânica e citoplasmática. Estima-se que uma quantidade significativa das ADAMs seja proteoliticamente inativa, devido à ausência de motivos íntegros para a ligação do zinco envolvido na catálise enzimática (WOLFSBERG e WHITE, 1996). Estudos têm demonstrado um importante papel

dessas moléculas na fertilização do óvulo e fusão de mioblastos através de ligações ADAM-integrina (BLOBEL *et al*, 1992).

Recentemente, foi descrita outra uma família de proteínas multimodulares, as ADAMTS (ADAM *with Thrombospondin motifs*). Seus integrantes diferem das ADAMs por não possuírem o domínio com repetições do EGF e ladeando o domínio rico em Cys, apresentam domínios com repetições do tipo-1 encontrada na trombospondina (TSP) (HURSKAINEN *et al*, 1999). ADAMTS parecem estar envolvidas com diversos processos biológicos como inflamação, morfogênese de órgãos, desenvolvimento e processamento do pró-colágeno (TANG, 2001).

O domínio desintegrina de ADAMs e ADAMTs, geralmente possuem substituições no tripeptídeo RGD. Outra variação é o fato de apresentarem uma Cys adicional adjacente a esse motivo e que possivelmente pode contribuir para a ocorrência de diferenças estruturais quando comparado com desintegrinas de venenos viperídicos (ZHANG, X. P. *et al.*, 1998). Apenas uma ADAM apresenta RGD, a ADAM 15.

1.4. DOENÇAS POTENCIALMENTE TRATÁVEIS PELA INIBIÇÃO DE INTEGRINAS

Em 2001, as doenças cardiovasculares e neoplásicas foram responsáveis por 27% e 13%, respectivamente, das causas de morte no país (Doenças cardiovasculares no Brasil. Ministério da Saúde: Sistema Único de Saúde – SUS, 1993). Resultados experimentais utilizando desintegrinas indicam que ambas as patologias são potencialmente sensíveis à inibição de integrinas (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1997; CHIANG, SWAIM e HUANG, 1994; BEVIGLIA, STEWART e NIEWIAROWSKI, 1995; YEH, PENG, e HUANG, 1998), assim como a osteoporose (FISHER *et al.*, 1993). Breves

considerações epidemiológicas a respeito dessas patologias são descritas a seguir:

1.4.1. Câncer

No ano de 2002, foram registrados em todo o mundo 10,9 milhões de novos casos de câncer, com cerca de 6,7 milhões de mortes, sendo que 24,6 milhões de indivíduos convivem com a doença (até três anos após o diagnóstico). O tipo majoritário de câncer é o de pulmão, seguido pelo de mama (PARKIN et al., 2005). A doença é a principal causa de mortes em alguns países desenvolvidos como o Japão e Austrália. No mundo, é a causa de 12% das mortes.

No Brasil, foram registrados 81.884 casos da doença no ano de 1995 (BOSETTI et al., 2005). Em 2002, foram registrados cerca de 400.000 novos casos e 129.850 mortes (13,2% das mortes), deixando-a como a segunda causa de morte no país dentre as doenças diagnosticadas (PIVETTA, 2004). Para 2005, estimam-se 467.440 novos casos de câncer (Estimativa 2005 - Incidência de Câncer no Brasil, 2004). Apesar de massivos investimentos mundiais na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, os resultados obtidos ainda são insuficientes (PIVETTA, 2004), indicando claramente a necessidade do emprego de novas estratégias capazes de fornecer novos tratamentos, como por exemplo, o emprego de associações farmacêuticas, o emprego de bloqueadores de metástases e de inibidores da angiogênese tumoral.

1.4.2. Trombose

Na década de 80, o coeficiente de mortalidade por doenças cardiovasculares aumentou 13,3%, e nos primeiros anos da década de 90 já representava a primeira causa de morte, correspondendo a aproximadamente

34% dos óbitos no país (Doenças cardiovasculares no Brasil, 1993). Ainda hoje, patologias cardiovasculares são as que mais matam no Brasil dentre as doenças diagnosticadas, onde o número de mortes por 100.000 habitantes é praticamente o dobro de Portugal (GREENBERG, RAYMOND e LEEDER, 2005). O número de mortes decorrentes de problemas no aparelho circulatório é praticamente o dobro do número de mortes por câncer.

Aproximadamente 10% dos casos de embolismo pulmonar sintomático causam a morte em até uma hora após o seu início (STEIN e HENRY, 1995). Se deixados sem tratamento adequado, cerca de 30% dos pacientes inicialmente com embolia pulmonar não-fatal terão uma recorrência fatal (ALPERT e DALEN, 1994). O tromboembolismo venoso é citado como a maior causa de morbidade entre os pacientes hospitalizados nos EUA (ALPERT e DALEN, 1994; DALEN e ALPERT, 1975). O embolismo pulmonar pode ser a causa mais comum de óbitos evitáveis em hospitais (MORRELL e DUNNILL, 1968). Durante as duas últimas décadas, a prevenção medicamentosa do tromboembolismo venoso tem sido largamente aceita como uma estratégia efetiva e com boa relação custo benefício. Os órgãos competentes americanos (CLAGETT et al., 1998) e europeus (*Prevention of venous thromboembolism*, 1997) têm sugerido a profilaxia para virtualmente todos os grupos de pacientes hospitalizados.

1.4.3. Osteoporose

A osteoporose (doença que leva a diminuição absoluta da quantidade de massa óssea) e desestruturação da sua microarquitetura, sendo a fratura a sua manifestação clínica) é considerada um grave problema de saúde pública e uma das doenças mais importantes associadas com o envelhecimento. Entre as suas

conseqüências estão dores freqüentes, perda de movimento, inabilidade para execução de tarefas diárias e, em muitos casos, até a morte.

Durante o “Congresso Mundial de Osteoporose da IOF” foram propagadas informações alarmantes em relação ao progresso da osteoporose:

i. Nos próximos 50 anos, o aumento no número mundial de fraturas de quadril em homens e mulheres será de uma ordem de grandeza superior a dois (CHANT et al., 2002). Na América Latina ocorrerão 655.648 fraturas de quadril totalizando 13 bilhões de dólares anuais com gastos diretos, representando metade das fraturas mundiais (COOPER, CAMPION e MELTON, 1992).

ii. No Brasil, somente uma pessoa em cada cinco com osteoporose recebe algum tipo de tratamento (ZABAGLIA, COSTA-PAIVA e PINTO-NETO, 2001). No país, são estimadas cerca de 100.000 fraturas de quadril por ano (Congresso Mundial de Osteoporose da IOF, 2005).

iii. Cerca de 10 milhões de brasileiros sofrem com osteoporose, 2,4 milhões de pessoas terão fraturas a cada ano. Destes pacientes, 200.000 morrerão como conseqüência direta de suas fraturas (Congresso Mundial de Osteoporose da IOF, 2005).

As doenças supracitadas acometem um número bastante elevado de pessoas no Brasil e em todo o mundo, despertando o interesse aplicado de diversos pesquisadores. Empresas farmacêuticas certamente não estão alheias a esses dados, investindo em novas tecnologias (como a bioinformática) para o desenvolvimento de terapias contra tais doenças. O cenário farmacêutico nacional mostra-se bastante incipiente no emprego de tais metodologias inovadoras para o desenvolvimento de fármacos. A seguir é dada uma breve visão da posição do Brasil nesse panorama.

1.5. O CENÁRIO FARMACÊUTICO BRASILEIRO

O setor farmacêutico no Brasil, cujo faturamento é de cerca de US\$ 5,6 bilhões anuais (*Retail Pharmacy Sales, 12 months to March 2005, 2005*), conta com a presença das grandes indústrias farmacêuticas multinacionais, como Merck Sharp & Dohme, Pfizer, Glaxo Smith Kline e Bayer, cujos faturamentos respectivos mundiais são da ordem de US\$ 51 bilhões (Merck Sharp & Dohme, 2005), US\$ 32 bilhões (Pfizer, 2005), US\$ 27 bilhões (Glaxo Smith Kline, 2005) e US\$ 27 bilhões (Bayer, 2005) por ano, respectivamente.

Dentre as indústrias farmacêuticas brasileiras com maior faturamento estão a EMS-Sigma Pharma, Eurofarma, Aché, Teuto e Biosintética, todas com faturamento anual inferior a R\$ 750 milhões (*Genéricos crescem com novos remédios, 2005; Dados financeiros - ACHÉ, 2005; Indústria farmacêutica: Quem ganha com os genéricos, 2005*). A diferença relativa do capital das indústrias multinacionais quando comparado ao das nacionais é esmagadora. Apesar dos vários esforços governamentais em medidas de autodefesa, como foi o exemplo da quebra de patentes de medicamentos ou a estimulação à comercialização de medicamentos genéricos, as soluções são apenas paliativas e incapazes de causar impactos significativos nesse quadro.

A história do desenvolvimento tecnológico e científico dos países melhor posicionados no cenário farmacêutico-biotecnológico mundial sugere que a geração de competências e tecnologia nacional só será possível com a aproximação entre o setor de produção de conhecimento (Universidades) e o setor produtivo (Empresas e Indústrias). No que se refere à indústria farmacêutica, o Brasil pode utilizar-se de sua extraordinária biodiversidade como vantagem competitiva para a conquista de novos espaços no contexto mundial.

É estimado que o setor farmacêutico internacional invista cerca de 7% de seu faturamento anual em P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) direcionados a programas de descoberta de novos fármacos.

Para alcançar as exigências de produtividade impostas pelos elevados níveis de investimentos em P&D, as maiores companhias farmacêuticas do mundo têm adotado como estratégia principal o investimento em novas tecnologias para a descoberta de fármacos. Dentro deste paradigma, destaca-se o notável crescimento do emprego de técnicas computacionais avançadas relacionadas com estudos em quimio- e bioinformática (LIU et al., 2002), representando uma abordagem moderna de planejamento tanto baseada na estrutura do receptor biológico quanto na estrutura do ligante bioativo (LI et al., 1996; BABU et al., 1995; VON ITZSTEIN et al., 1993; BLUNDELL et al., 1990).

Avanços estratégicos na pesquisa de novos fármacos no Brasil passam essencialmente pelo estabelecimento de competências nas diversas áreas do conhecimento envolvidas por parte da academia e, sobretudo, da indústria farmacêutica nacional.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Conforme descrito nas seções acima, é grande o potencial de aplicação de desintegrinas, incluindo a possível utilização para o desenvolvimento de fármacos contra doenças de elevada relevância atual. Sendo motivado por algo além da curiosidade científica básica, esse projeto procurou focar justamente a aplicação dessas biomoléculas. Apesar de sua pequena contribuição, o projeto procurou dar sua parcela de contribuição com a sociedade que se encontra sedenta pelo retorno de seus investimentos. Ainda nessa linha de raciocínio, contribui também para a consolidação e ampliação da competência nacional destinada ao desenvolvimento farmacêutico, visando reduzir a defasagem, a dependência tecnológica e econômica em relação a outros países.

Segundo essas inspirações e motivações este trabalho objetivou:

- ✦ A clonagem de desintegrinas de *Bothrops alternatus* (urutu) a partir de uma biblioteca de cDNA construída a partir das glândulas veneníferas da serpente. Essa estratégia foi escolhida, pois, fornece uma amostra rica e estável de biomoléculas presentes no veneno, independentemente da necessidade da utilização de outros animais.

- ✦ Expressão e purificação das toxinas em sistema heterólogo, tendo o sistema bacteriano como primeira escolha. O sistema bacteriano é, em muitos casos, o sistema mais prático, econômico e de maior rendimento para a expressão de proteínas.

- ⊕ Caracterização bioquímica visando a confirmação de características da toxina incluindo sua seqüência primária.

- ⊕ Realização de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* com a toxina caracterizada. Uma vez obtida a toxina pura, sua atividade deve ser validada para a verificação da ocorrência de possíveis problemas relacionados ao envelhecimento ou estabilidade.

- ⊕ Estudos estruturais por bioinformática. A investigação de características estruturais auxilia na compreensão da atividade e subsidia a formulação de propostas tecnológicas inovadoras. Devido ao limitado tempo de execução, não foi objetivo desse projeto a realização de estudos estruturais baseados em experimentação utilizando técnicas como difração de raios X a partir de cristais ou ressonância nuclear magnética (NMR).

3. MATERIAIS

Os principais materiais utilizados no presente trabalho são descritos nas tabelas a seguir:

Tabela 5: Cepas bacterianas de *Escherichia coli*.

Cepa	Genótipo	Marca
XL1-Blue MRF ⁻	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 rel A1 lac [F}^{\text{-}} \text{ proAB lacI}^{\text{q}}\Delta\text{M15 tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$	Stratagene
SOLR	$e14^{\text{-}}(\text{McrA}^{\text{-}}) \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})171 \text{ sbcC recB recJ uvrC umuC:}^{\text{-}} \text{:Tn5 (Kan}^{\text{r}}\text{) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 } \lambda^{\text{R}}$ [F ⁻ proAB lacI ^q ΔM15] Su ⁻ (não supressor)	Stratagene
DH5- α	F ⁻ ϕ 80dlacZΔM15 $\Delta(\text{lacZYA-arg}^{\text{-}} \text{F}) \text{ U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r}_{\text{k}}^{\text{-}}, \text{m}_{\text{k}}^{\text{+}}\text{) phoA supE44} \lambda^{\text{-}} \text{ thi-1 gyrA96 relA1}$	Invitrogen
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Novagen

Tabela 6: Linhagens celulares.

Linhagem	Fornecedor	Descrição
B16F10-2B8	Alexandre Kauskot / Arnaud Bonnefoy (U553-INSERM)	Células de melanoma murino transfectadas com o gene da luciferase
HMEC-1	ATCC	Células endoteliais de microcapilar de derme
MDA-MB-231	ATCC	Células de tumor mamário

Tabela 7: Vetores.

Nome	Marca
UNIZAP XR	Stratagene
pET28a	Novagen
TOPO TA	Invitrogen

Tabela 8: Enzimas de restrição.

Nome	Tipo	Sítio de Restrição	Marca
<i>Bam</i> HI	S	G GATCC	Invitrogen
<i>Eco</i> RI	S	G AATTC	Invitrogen
<i>Xho</i> I	S	G AGCTC	Invitrogen

*S("Sticky"): Restrição que gera extremidades do tipo coesivas no DNA.

Tabela 9: Outras enzimas utilizadas nos processos de tecnologia do DNA recombinante.

Nome	Atividade	Marca
StrataScript RT	Transcrição reversa de RNAs	Stratagene
RNAse H	Hidrólise de RNAs	Stratagene
DNA Polimerase I	Polimerização de dNTPs	Stratagene
<i>Pfu</i> DNA polimerase	Construção de extremidades não coesivas	Stratagene
T4 DNA ligase	Ligação de extremidades de moléculas de DNA	Stratagene
T4 polinucleotídeo quinase	Fosforilação de nucleotídeos	Stratagene
<i>Taq</i> DNA polimerase recombinante	Polimerização de nucleotídeos (termo resistente)	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA polimerase	Polimerização de nucleotídeos (termo resistente)	Promega

Tabela 10: Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*).

Nome	Seqüência
1F	5'-CGC- <u>GGATCC</u> -GGAAATGAACTTTTGGAG-3' <i>Bam</i> HI 18 Bases N-terminais da ACLD
2F	5'-TGG- <u>GGATCC</u> -GGI(C/T)TIAA(A/G)GGICA(C/T)T-3' <i>Bam</i> HI 18 Bases do Pró-domínio da BaG
3F	5'-ATGGCICAYGARATGGG-3' 11 Bases do domínio catalítico da BaG
4F	5'-TGG- <u>GGATCC</u> -ATGATC(C/G)A(G/A)GTTCTCTTG-3' <i>Bam</i> HI 18 Bases do Pró-domínio de metaloproteases
5F	5'-TGG- <u>GGATCC</u> -G(A/C)(G/T)(G/A)I(G/C/A)GGAGAAGAAATGT-3' <i>Bam</i> HI 18 Bases do N-terminal de desintegrinas
T7 promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
M13 (-20) forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG3'
1R	5'-TCC- <u>GAATTC</u> -TCA-AATCTGAGAGAAG-3' <i>Eco</i> RI Ter 13 Bases C-terminais da ACLD
2R	5'-TGG- <u>GAATTC</u> -(C/T)TTIGTICIGGIA(A/G)-3' <i>Eco</i> RI 18 Bases C-terminais da BaG
3R	5'-TGG- <u>GAATTC</u> -TCA-AT(T/C)(C/T)(C/G)(T/C)(G/A)GGACA-3' <i>Eco</i> RI Ter 15 Bases C-terminais de desintegrinas
4R	5'-TGG- <u>GAATTC</u> -TTTTTTTTTTTT-3' <i>Eco</i> RI 12 Bases poli-dT
T7 terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
M13 reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

I=inosina, T=Timidina, A=Adenina, G=Guanina, C=Citosina. BaG = *Bothrops alternatus* gelatina, uma metaloprotease-desintegrina dimérica purificada em resina contendo gelatina cuja seqüência parcial foi obtida através de espectrometria de massa (Dados não publicados). Ter = Códon de terminação de tradução (localizado na fita complementar).

Tabela 11: Marcadores de Massa Molecular.

Nome	Quantidade utilizada (μ l)	Natureza	Marca
Low DNA Mass Ladder	4	DNA	Invitrogen
High DNA Mass Ladder	2	DNA	Invitrogen
Benchmark Protein Ladder	5	Proteína	Invitrogen

Tabela 12: Kits.

Nome	Utilidade	Marca
cDNA Synthesis	Síntese de cDNAs	Stratagene
ZAP-cDNA® Synthesis	Construção recombinante com o vetor UNIZAP	Stratagene
ZAP-cDNA® Gigapack III	Empacotamento viral do vetor UNIZAP	Stratagene
Gold cloning	Clonagem utilizando bacteriófagos	Stratagene
PolyAtract mRNA Isolation System III	Purificação de mRNAs	Promega
Wizard Plus Minipreps DNA Purification System	Extração e purificação de DNA plasmidial	Promega
DNA Purification	Purificação de DNAs em géis de agarose	Bio Rad
PolyAtract mRNA Isolation System III	Purificação de mRNAs	Promega
BCA Protein Quantification	Quantificação de proteínas	Pierce
Cell proliferation kit II	Monitoramento de células viáveis	Roche

Tabela 13: Outros reagentes.

Descrição	Marca
Reagentes para o cultivo de células de mamíferos, Trizol	Invitrogen
dNTPs, vitronectina humana	Promega
Anticorpos anti-integrina	Chemicon
Anticorpos inespecíficos de camundongo (não reconhecem biomoléculas humanas)	Uptima
Hidrocortisona	Sigma-Aldrich
EGF	R&D Systems
Reagente para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (<i>Protein Assay</i>)	Bio Rad

Tabela 14: Resinas cromatográficas

Nome	Descrição	Marca
Ni-NTA	Cromatografias de afinidade por quelação de metal (Separação por afinidade ao Níquel)	Quiagen
Sephadex G-75	Cromatografia por gel filtração (separação por forma/tamanho molecular)	Pharmacia

Tabela 15: Equipamentos

Nome	Utilidade	Marca
FACscalibur	Citometria de fluxo (FACS)	Becton Dickinson
Chrono-Log	Agregação plaquetária	Havertown (Philadelphia, PA, E.U.A.)
ABI Prism 377TNA Sequencer	Sequenciamento automático de DNA	Perkin Elmer
Perkin Elmer 2400	Realização de PCRs	Perkin Elmer
Kodak digital Science	Documentação de imagens	Kodak
Ultraspec 2000	Espectrofotômetro	Amershan-Pharmacia
SC210A Speed Vac	Concentração e secagem de amostras.	GMI
Monitor UV-1	Monitoramento de absorbâncias durante cromatografias	Amershan-Pharmacia
Rec 101	Registro de perfis de absorbâncias durante cromatografias	Amershan-Pharmacia
LC-10AD	Cromatografia líquida de alta performance	Shimadzu
PPSQ-23A	Sequenciamento automático de proteínas	Shimadzu
RediFrac	Coletar frações cromatográficas	Pharmacia

Todos os demais reagentes utilizados possuíam grau de pureza analítico.

4. MÉTODOS

Como estratégia para que os objetivos fossem alcançados, optou-se pela construção de uma biblioteca, onde biomoléculas presentes na glândula de veneno fossem armazenadas de maneira estável, codificadas na forma de DNA. Tal metodologia baseia-se na extração dos mRNAs presentes em um tecido ou organismo, suas conversões em moléculas quimicamente mais estáveis e em suas ampliações clonais utilizando microorganismos.

Inicialmente são sintetizados híbridos RNA/DNA pela ação da enzima transcriptase reversa (RT), utilizando mRNAs como molde. Os DNAs sintetizados a partir dos mRNAs são conhecido como cDNAs, DNA complementares. Em seguida, as moléculas de RNAs são degradadas enzimaticamente e novas fita de DNA, idênticas aos mRNAs originais (excetuando-se as substituições de uracilas por timidinas), são sintetizadas utilizando a primeiras fitas de DNAs como molde. O conjunto dos cDNAs obtidos é conhecido como biblioteca de cDNAs. Posteriormente as moléculas de cDNA são incorporadas a vetores e replicadas *in vivo*, aumentando a quantidade dos transcritos obtidos inicialmente.

Alternativamente, em um único passo, é possível converter moléculas de mRNA em moléculas de DNA, seguindo-se a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

As etapas que concernem a obtenção de mRNAs e a construção de uma biblioteca de cDNA são brevemente descritas a seguir.

4.1. OBTENÇÃO DE mRNAs

Visando impedir a degradação de moléculas ribonucleotídicas, toda água utilizada no processo de obtenção de mRNAs foi tratada com DEPC 0,1% (inibidor de RNases) e autoclavada. Essa solução também foi empregada na lavagem do material utilizado.

4.1.1. Extração de RNAs totais

O tecido utilizado para a extração dos RNAs foi a glândula venenífera de um espécime macho da espécie *Bothrops alternatus* (família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*, popularmente conhecida como urutu), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Augusto Shinya Abe (UNESP - Rio Claro). O animal, com aproximadamente três anos, foi alimentado com um camundongo a cada 20 dias. Três dias após a extração do veneno o animal foi morto, suas glândulas dissecadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C até o seu processamento.

Para a obtenção de RNA total, o tecido foi imerso (100mg/ml) no reagente Trizol®. A seguir, deu-se procedimento as cinco fases do método modificado proposto por Chomczynski & Sacchi (1987). Incluem-se nessas fases a homogeneização do tecido no reagente, a separação de fases através da adição de clorofórmio seguida de centrifugação, a precipitação RNA da fase aquosa utilizando isopropanol, a lavagem com etanol 75% e a redissolução do RNA obtido em água livre de RNase.

4.1.2. Purificação de RNAs mensageiros (mRNAs)

A purificação dos mRNAs foi realizada utilizando o *Kit* Polyatract® mRNA Isolation System (Promega). O sistema utiliza oligonucleotídeos biotinilados poli-dT para a hibridização específica com a cauda de poli-dA presente na maioria dos mRNAs eucarióticos maduros. Os híbridos são capturados por esferas paramagnéticas conjugadas a estreptavidina, que por sua vez são atraídas magneticamente. Em seguida, o mRNA capturado é lavado e então eluído através da dissociação do DNA híbrido. O processo de obtenção de mRNAs foi monitorado por meios espectrofotométricos e eletroforéticos (Subseção: 9.1.4).

4.2. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNAs

Utilizando-se 5µg dos mRNAs obtidos deu-se prosseguimento a construção da biblioteca de cDNAs utilizando os seguintes *Kits* (Stratagene): cDNA Synthesis, ZAP-cDNA® Synthesis, ZAP-cDNA® Gigapack III e Gold cloning.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações do fabricante e são resumidamente descritos a seguir.

4.2.1. Síntese do cDNA

A síntese dos cDNAs teve início utilizando o *Kit*, cDNA Synthesis. O *kit* torna prático o procedimento de transcrição reversa utilizando um oligonucleotídeo iniciador que se liga especificamente a moléculas de RNA (*linker primer*). A ligação desse oligonucleotídeo é devido à presença de uma seqüência poli-dT que hibridiza especificamente com a cauda de poli-dA presente nos

mRNAs. Adicionalmente, um sítio de restrição para a enzima *Xho* I está presente. Uma vez formado o híbrido, o processo de síntese *in vitro* da primeira fita do cDNA é iniciado pela adição da enzima StrataScript RT na presença de dNTPs. Na mistura de dNTPs, apenas nucleotídeos de citosina são metilados. A incorporação desse nucleotídeo previne a digestão do DNA recém formado por enzimas como a *Xho* I, porém, simultaneamente o torna alvo de enzimas presentes em linhagens bacterianas $McrA^+ McrB^+$. Assim, é necessária a utilização de linhagens $McrA^- McrB^-$ como a XL1Blue MRF' nas etapas de amplificação clonal.

A síntese da segunda fita do cDNA foi iniciada pela adição de RNase H e de DNA polimerase I. A RNase H degrada os mRNAs que serviram de molde, enquanto que DNA polimerase I sintetiza a segunda fita do cDNA.

4.2.2. Ligação no vetor Uni-ZAP XR

Uma vez sintetizados os cDNAs com dupla fita, procederam-se suas recombinações com o vetor UNIZAP XR. Para tanto suas extremidades foram inicialmente modificadas pela Pfu DNA polimerase. A enzima preenche espaços resultantes de nucleotídeos não pareados, tornando as extremidades não coesivas ou cegas (*blunt*). Em seguida, os cDNAs foram purificados através da adição de fenol-clorofórmio (1:1), centrifugados, e precipitados da fase aquosa pela adição de Acetato de Sódio 3M e etanol 100%. Após centrifugação, o precipitado obtido foi lavado com etanol 70%, centrifugado novamente e o sobrenadante descartado.

Através da extremidade não coesiva de um adaptador, ele foi ligado aos cDNAs utilizando a enzima T4 DNA ligase. A extremidade não ligada do

adaptador, restrita pela enzima *Eco* RI, gerou uma extremidade coesiva nos cDNAs útil durante a etapa de ligação unidirecional no vetor UNIZAP XR.

Os cDNAs foram então submetidos a uma reação de fosforilação pela enzima T4 polinucleotídeo quinase e hidrolisados pela enzima *Xho* I. Os cDNAs, agora coesivos em ambas as extremidades, foram purificados através de precipitação e centrifugação.

Por fim, os cDNAs foram submetidos à ligação com o vetor UNIZAP XR (1:10, m/m) na presença da enzima T4 DNA ligase.

4.2.3. Empacotamento viral do produto da ligação

O empacotamento dos DNAs recombinantes foi realizado sob temperatura ambiente durante 2 horas, adicionando-se 4 μ l da reação de ligação (aproximadamente 0,8 μ g de vetor UNIZAP recombinante) ao extrato de empacotamento incluso no *Kit* ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning. Uma vez empacotados, os resíduos do processo foram eliminados por precipitação adicionando-se tampão SM (500 μ l), clorofórmio (20 μ l) e centrifugação (5.000g, 10 segundos).

4.2.4. Preparo das linhagens hospedeiras

Bactérias provenientes de uma única colônia foram crescidas em meio LB suplementado com MgSO₄ (10mM) e Maltose (0,2%, m/v), até D.O._{600nm} = 1,0. As células bacterianas foram então isoladas através de centrifugação (500g, 10 minutos) e diluídas com MgSO₄ (10mM) para uma D.O._{600nm} = 0,5.

4.2.5. Titulação e plaqueamento dos bacteriófagos

Para a avaliação da eficiência do empacotamento, os fagos (1 μ l de sua solução ou de sua diluição 1:10) foram incubados (37°C, 15 minutos) com 200 μ l da linhagem XL1 Blue MRF' de *E. coli*, preparada como descrito no item anterior (Subseção: 4.2.4). Após a adição de NZY top Agar (2-3ml, 48°C), IPTG (0,5M, 15 μ l) e X-gal (250mg/ml em DMF, 50 μ l), as células foram imediatamente plaqueadas em NZY Agar (Subseção: 9.3). Decorridas de 6 a 8 horas de incubação à 37°C a placas de lise formadas foram contadas.

Para a titulação da biblioteca de fagos amplificada utilizou-se 1 μ l de cada uma das seguintes diluições: 1:10.000, 1:100.000 e 1:1.000.000, sendo estimado o número de unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/ml).

4.2.6. Amplificação da biblioteca de bacteriófagos recombinantes

Os fagos recombinantes foram amplificados através da incubação de 10 amostras contendo aproximadamente 5×10^4 PFUs com 600 μ l de células bacterianas hospedeiras (37°C, 15 minutos). Após a infecção, foi adicionado NZY top Agar (6,5ml, 48°C) e as células bacterianas foram imediatamente plaqueadas em placas de petri de 150mm. Decorridas 6-8 horas à 37°C, as placas tiveram sua superfície embebida em tampão SM (8-10ml, Subseção: 9.4) e foram incubadas (20rpm, 4°C, *overnight*). Os bacteriófagos foram recuperados no sobrenadante, ao qual foi adicionado clorofórmio para uma concentração final de 5% (v/v) para a remoção de restos celulares através de centrifugação (500g, 10 minutos). Ao sobrenadante obtido adicionou-se clorofórmio para uma concentração final de 0,3%.

A biblioteca amplificada foi então armazenada à 4°C e algumas alíquotas à -80°C (DMSO, 7%).

4.3. TRIAGEM DA BIBLIOTECA E SUBCLONAGENS

Como estratégia preliminar para a triagem de desintegrinas, foram conduzidas PCRs envolvendo todas as combinações possíveis entre oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso disponíveis (Tabela 10), utilizando as condições de reação abaixo (Tabela 16).

Tabela 16: Componentes das reações de PCR.

Componente	Volume (µl)
Água Mili-q	34
Tris-HCl 50mM, pH 9,0	20
MgCl ₂ 25mM	6
KCl 200mM	25
dNTP 10mM (de cada)	2
Oligonucleotídeo senso	4
Oligonucleotídeo anti-senso	4
DNA molde	4
Taq DNA polimerase	1
Total	100

O termociclador foi configurado para o seguinte programa (Figura 13):

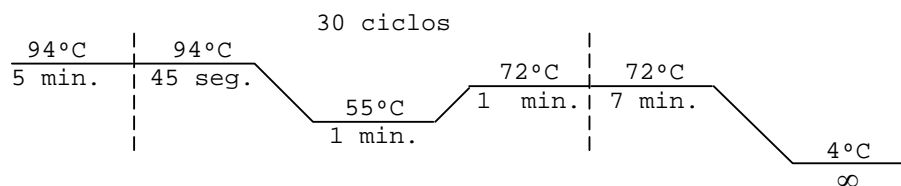


Figura 13: Programa utilizado nas reações de PCR. Visando a amplificação do maior número possível de desintegrinas da biblioteca de cDNAs obtidas foram testadas todas as combinações possíveis de oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso contidos na tabela 10.

Para a clonagem no vetor pET28a, o produto da amplificação e o vetor foram restritos com as enzimas *Bam* HI e *Eco* RI. Após serem purificados através da eluição de suas bandas eletroforéticas em géis de agarose, as moléculas de DNA foram ligadas (proporção molar de respectivamente 1:4) utilizando a enzima T4 DNA ligase na presença de ATP (16°C, durante uma noite). O DNA recombinante, produto da reação de ligação, foi utilizado para a transformação de células competentes da linhagem DH5- α de *E. coli* (Subseções: 9.1.5 e 9.1.6), visando à amplificação clonal do novo plasmídeo. Buscando maximizar a expressão da proteína-alvo, o novo plasmídeo foi utilizado para a transformação de bactérias da linhagem BL21(DE3) de *E. coli*.

Para a clonagem no vetor TOPO TA a amplificação foi realizada com uma enzima *Taq* polimerase que adiciona uma desoxiadenosina nas extremidades de seu produto de amplificação. O fato de o vetor TOPO TA linearizado possuir desoxitimidinas livres propicia a ligação vetor-inserto através do pareamento entre as bases nitrogenadas.

A reação de ligação foi conduzida segundo as recomendações do fabricante. Brevemente, os componentes da tabela abaixo (Tabela 17) foram misturados e encubados por cinco minutos à temperatura ambiente. O produto da ligação foi utilizado para a transformação de bactérias competentes.

Tabela 17: Componentes das reações de clonagem no vetor TOPO TA.

Componente	Volume (μl)
Produto da PCR	4
Solução de sais	1
Vetor TOPO TA	1
Total	6

4.3.1. Sequenciamento automático de DNA

As subclonagens foram validadas através do seqüenciamento de DNA. A análise foi gentilmente realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (Instituto de Física da USP – São Carlos) sob a supervisão do Prof. Dr. Otávio Thiemann, utilizando um seqüenciador automático (ABI Prism 377TNA Sequencer).

No caso de subclonagens no vetor pET28a, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR foram o T7 promoter e o T7-terminator (Tabela 10). Já para as subclonagens no vetor TOPO TA, os oligonucleotídeos foram o M13-forward e M13-reverse (Tabela 10). As concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram ajustadas para 5pmoles/ μ l e a dos vetores para 150ng/ μ l.

4.4. CARACTERIZAÇÕES BIOQUÍMICAS E CELULARES

4.4.1. Ensaio de expressão e solubilidade

Culturas de *Escherichia coli* BL21(DE3) contendo o vetor recombinante foram crescidas a 37°C em meio LB seletivo contendo canamicina (30 μ g/ml) até que a D.O.₆₆₀ estivesse contida na faixa entre 0,4 e 0,6. Neste momento, foi colhida uma amostra (T0) para verificação da expressão protéica basal, seguindo a indução da transcrição do DNA plasmidial pela adição de IPTG (concentração final igual a 0,5mM). Duas horas após a indução, nova amostra foi retirada (T2). O restante da cultura foi centrifugado. As células foram ressuspensas em tampão A (Tris-HCl 40mM, NaCl 0,5M, Imidazol 5,0mM) e lisadas através de sonicação.

A solubilidade da proteína recombinante foi investigada centrifugando-se o lisado (13.000rpm por 15 minutos) e coletando-se o sobrenadante obtido (S1). O

precipitado foi solubilizado em tampão A desnaturante (suplementado com uréia 6M). Após incubação (4°C, 1 hora), o precipitado foi novamente centrifugado. O novo sobrenadante (S2) e o precipitado foram separados e guardados. As alíquotas das amostras obtidas (T0, T2, S1, S2 e ppt) foram então analisadas através eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4.4.2. Purificação da proteína heteróloga

As amostras obtidas no item anterior, que apresentavam a proteína de interesse solubilizada, foram fracionadas sob condições desnaturantes em coluna de Níquel-Sepharose (cromatografia de quelação de metal) sob fluxo constante e igual a 0,5ml por minuto.

A coluna foi previamente equilibrada com quatro volumes de tampão A desnaturante. O mesmo tampão foi empregado na 1ª lavagem após a passagem da amostra para a remoção de proteínas sem afinidade pela resina. Utilizando o tampão B desnaturante (Tampão A desnaturante contendo 20mM de Imidazol), foi realizada uma segunda lavagem da coluna visando à remoção de proteínas ligadas com baixa afinidade.

Para eluição das proteínas ligadas com maior afinidade ao níquel, foi utilizado o tampão C desnaturante (tampão A desnaturante contendo 1M de Imidazol). As frações foram coletas com o auxílio de um coletor automático (Pharmacia), configurando-se o tempo de coleta por fração para três minutos (1,5ml/fração).

As frações eluídas da cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA que continham a proteína de interesse foram reunidas e dialisadas contra Uréia (3M)

em água Milli-Q para a redução da pressão osmótica e então outras três vezes contra água Milli-Q.

Após a diálise a amostra foi concentrada (SC210A Speed Vac) para um volume inferior a 2% do total da resina utilizada na filtração (Sephadex G-75). A cromatografia foi conduzida com fluxo de 0,7ml por minuto em tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,0. A presença de material protéico nas frações cromatográficas foi monitorada através da detecção da absorbância a 280nm (Monitor UV-1) e documentada através de impressão (Rec 101). As frações representativas de picos de absorbâncias foram analisadas através de SDS-PAGE e géis de Tricina para a verificação do grau de pureza.

As frações obtidas na filtração em gel correspondendo a picos cromatográficos com maior pureza foram reunidas, dialisadas e submetidas à HPLC baseada em interações hidrofóbicas (coluna C-8). A fase móvel foi formada por um gradiente da solução A (0,1% de TFA) para B (0,1% de TFA e 90% de Acetonitrila).

O equipamento utilizado foi um sistema Shimadzu (LC-10AD, Detector SPD-10A UV e comunicador CBM 10A) controlado pelo programa computacional LC-10 Class.

4.4.3. Linhagens e culturas celulares

Visando caracterizar os efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo* da desintegrina em estudo, foram utilizadas células de tumor de mama humano (MDA-MB-231), de melanoma murino (B16F10-2B8) e de microcapilar de derme humano (HMEC-1).

As células MDA-MB-231 entre a 90^a (nonagésima) e 100^a (centésima) passagem foram cultivadas em DMEM contendo FBS (10%), L-glutamine (2 mM), HEPES (15 mM HEPES), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e fungizona (5 µg/ml).

Células B16F10 são caracterizadas na literatura por sua elevada expressão de integrina $\alpha V\beta 3$. As células B16F10-2B8 utilizadas neste trabalho foram obtidas por Alexandre Kauskot pela transfecção de células B16F10 com o plasmídeo pEGFPLuc (BD Biosciences, Rungis, França) sob a orientação do Dr. Arnaud Bonnefoy na unidade U553 (*"Hemóstase, Endothélium et Angiogênese"*, Paris, França) do INSERM (*"Institute Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale"*). O plasmídeo contém o gene para a resistência a neomicina, o gene da GFP e o da luciferase. O clone B16F10-2B8 foi selecionado na presença de antibiótico (sulfato de neomicina) e também por sua bioluminescência (*in vitro* e *in vivo*) e poder metastático. Trata-se de uma linhagem tumoral altamente agressiva, com baixo requerimento de cultura e alta taxa de proliferação. As células, entre a 27^a (vigésima sétima) e a 32^a (trigésima) passagem, foram cultivadas em NaCl 0,9% (59%), DMEM (30%), FBS (10%), L-glutamine (2 mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml).

As células HMEC-1, de natureza endotelial, foram cultivadas em MCDB-131 suplementado com FBS (10 %), L-glutamine (2 mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml), EGF (10 ng/ml) e hidrocortisona (1 µg/ml). Foram utilizadas células entre a 10^a (décima) e 16^a (décima sexta) passagem para a realização dos experimentos.

Todas as culturas foram conduzidas em estufa umidificada, a 37°C, sob uma atmosfera contendo 5 % de CO₂.

4.4.4. Caracterização de integrinas por FACS

A expressão de algumas integrinas na superfície das linhagens celulares foi verificada por citometria de fluxo (FACS). Culturas em monocamada com cerca de 90% de confluência foram lavadas com PBS, desaderidas com EDTA (0,53 mM) e imediatamente ressuspensas em PBS rico em cálcio (0,9mM) e magnésio (0,5mM). Depois de centrifugadas (290 g, 5 minutos), as células foram ressuspensas em PBS/BSA (1% de BSA em PBS) e contadas.

Um total de 4×10^5 células provenientes da mesma cultura em 350 μ l foi incubado (4°C, 30 minutos) com anticorpo apropriado. Para o controle negativo, as células foram incubadas com anticorpos IgG1 de camundongo (diluição 1:350) que não reconhecem biomoléculas humanas. Para a sondagem de integrinas, diferentes amostras de células foram incubadas com anticorpos anti- $\alpha 2\beta 1$, anti- $\beta 1$ ou anti- $\alpha V\beta 3$ (diluição 1:100).

Decorrido o tempo de incubação com o primeiro anticorpo, as células foram lavadas com PBS/BSA, incubadas (4°C, 1 hora) com anticorpo anti-IgG de camundongos marcado isotiocianato de fluoresceína (FITC, diluição 1:100). Antes da leitura em aparelho de FACS (FACScalibur, BD), as células foram diluídas pela adição de PBS/BSA (1ml).

A análise foi realizada em três experimentos independentes. A média das medianas obtidas e seus erros padrões foram normalizados em relação ao sinal do controle negativo.

4.5. EFEITOS “IN VITRO”

Grande parte dos experimentos referentes aos efeitos da proteína em estudo, tanto *in vitro* como *in vivo*, só foram possíveis através do estabelecimento de parcerias com grupos externos. As parcerias estabelecidas são justificadas pela tradição dos grupos de pesquisa envolvidos como o da Profa. Dra. Russolina B. Zingali (Departamento de Bioquímica Médica - ICB/CCS – UFRJ) em estudos de hemostasia, ou dos grupos do Prof. Dr. Michel Crépin e Dr. Arnaud Bonnefoy (U553 – INSERM - França) em estudos de hemostasia e câncer.

4.5.1. Efeito na agregação plaquetária e ligação com a integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

Os ensaios de inibição da agregação plaquetária utilizando plasma rico em plaquetas (PRP) de coelho ou humano foram conduzidos em colaboração com o grupo chefiado pela Profa. Dra. Russolina B. Zingali (Departamento de Bioquímica Médica - ICB/CCS – UFRJ). Brevemente, o sangue foi coletado de coelhos mantidos no biotério da UFRJ e de indivíduos saudáveis que não fizeram uso de anti-inflamatórios no mês anterior à doação. O sangue coletado foi homogeneizado com citrato de sódio (3,8%) na proporção 9:1 (sangue:citrato).

O PRP de coelho foi obtido centrifugando-se o sangue a 375xg durante 20 minutos e o plasma pobre em plaquetas (PPP) por centrifugação à 1800xg durante 15 minutos. Para os ensaios com PRP humano, este foi fracionado por centrifugação à 150xg durante 15 minutos, enquanto que o PPP foi obtido por centrifugação à 1200xg durante 15 minutos. Utilizando-se o PPP como referência (branco), o PRP foi mantido sob agitação (1.100rpm) em cubetas de vidro siliconadas e monitorado em um agregômetro (Chrono-Log).

Utilizando PRP de coelhos, foram testados os efeitos de 70, 140 e 210nM da DisBa-01 (pré-incubada por 1 minuto) na agregação plaquetária induzida por colágeno tipo I (0,0025%) e de 140 e 280nM na agregação plaquetária induzida por ADP (5 μ M). Já em PRP humano diferentes concentrações de DisBa-01 (0, 100, 250, 500, 750 e 1000nM) foram testadas na agregação de plaquetas induzida por ADP (10 μ M).

Em colaboração com o Dr. Arnaud Bonnefoy e Alexandre Kauskot (U553, INSERM), foram realizados os ensaios de inibição da agregação de plaquetas lavadas de camundongos C57Bl6/j induzida por ADP (50 μ M), assim como, os ensaios de competição com fibrinogênio marcado (Fg-FITC) e anticorpos anti- α IIb β 3 pela ligação à integrina α IIb β 3 ativada.

Brevemente, as plaquetas lavadas obtidas (GOLDSMITH et al., 1994), foram incubadas por 1 minuto com diferentes concentrações de DisBa-01 (1, 10, 100 e 1000 nM) antes de serem colocadas em cubetas de agregômetro sob agitação. Foram então adicionados ADP (50 μ M), Ca⁺⁺ (2mM) e Mg⁺⁺ (1mM). A agregação plaquetária foi monitorada em agregômetro (Chrono-Log) pela transmissão ótica através da cubeta.

Nos ensaios de competição com o Fg-FITC, as plaquetas lavadas de camundongos C57BL6/j foram incubadas (30.000/ μ l) em tampão Tyrode contendo ADP (50 μ M), Ca⁺⁺ (2 mM), Mg⁺⁺ (1 mM), Fg-FITC (200nM) e diferentes concentrações de DisBa-01 (0, 1, 10 e 100nM), durante 30 minutos (37°C). Após a incubação o deslocamento do Fg-FITC ligado às plaquetas foi mensurado por citometria de fluxo (BONNEFOY et al., 2001).

Para ensaios de competição com o PAC-1-FITC (12,5 μ g/ml), plaquetas lavadas humanas foram incubadas (50.000/ μ l) em tampão Tyrode contendo ADP

(50 μM), Ca^{++} (2mM), Mg^{++} (1mM), PAC-1-FITC (12,5 $\mu\text{g/ml}$) e diferentes concentrações da toxina (0 a 10 μM). Após o período de incubação o deslocamento do anticorpo anti-integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ativada foi mensurado por citometria de fluxo (BONNEFOY et al., 2001).

4.5.2. Efeito na proliferação celular

Os ensaios para a análise do efeito da DisBa-01 na proliferação de células MDA-MB-231, B16F10-2B8 e HMEC-1, foi realizado na unidade sob a supervisão do Prof. Dr. Michel Crépin (U553, INSERM). As células foram semeadas em placas de 96 poços (2.5×10^4 /poço em 200 μL de meio adequado contendo soro fetal bovino) e incubadas por 7 horas em estufa para a promoção da adesão celular. Após este período, diferentes concentrações de DisBa-01 (0, 1, 5, 10, 50 e 100nM) foram adicionadas em cada poço, seguindo-se 24, 48 ou 72 horas de incubação. Depois desse período, o meio foi removido, os poços lavados com PBS (2x) e novo meio contendo XTT (150 μl) foi adicionado. Decorrido o tempo de incubação (4 horas), a placa foi lida a 450 e 620nm. Os valores obtidos a 620nm foram subtraídos daqueles obtidos a 450nm para cada poço e os resultados foram expressos como porcentagens dos valores controle (sem DisBa-01). Todas as incubações foram realizadas nas mesmas condições empregadas durante o cultivo.

4.5.3. Efeito na adesão de células B16F10-2B8 à vitronectina

Vitronectina, proteína da matriz extracelular e ligante da integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, foi imobilizada em placas de 96 poços (1 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ de DPBS/poço) pela incubação a 4°C durante a noite. Após a incubação, os poços foram bloqueados com solução

de BSA 1% (200µl/poço, temperatura ambiente) visando impedir a ocorrência de buracos na cobertura de vitronectina onde o plástico (passível de adesão celular) ficasse exposto.

Paralelamente, células B16F10-2B8, cultivadas conforme descrito anteriormente, foram desaderidas após lavagem com DPBS e incubadas com EDTA (0,53 mM, 2-4 minutos). Imediatamente, as células foram ressuspensas em DPBS rico em cálcio (0,9mM) e magnésio (0,5mM), centrifugadas (290g, 5 minutos) e ressuspensas em DPBS. Após contagem celular, as células foram ressuspensas para uma concentração de $3,5 \times 10^6$ células/ml de DPBS. Nesse momento, alíquotas de 350µl da suspensão celular foram adicionadas a diferentes tubos, aos quais, também foram adicionadas soluções de DisBa-01 para diversas concentrações finais (0, 1, 10, 100 e 1000nM). O volume da solução de DisBa-01 adicionado foi fixado fazendo-se uso de diluições adequadas da proteína. As suspensões celulares na presença ou ausência de DisBa-01 foram incubadas a 37°C durante 30 minutos.

Finalizado o tempo de incubação, a solução de BSA foi removida das placas de 96 poços e 100µl da suspensão celular foi adicionada a cada poço. Para cada concentração analisada foram realizadas triplicatas. A placa foi incubada durante 1 hora (37°C), tempo após o qual, os poços foram lavados com DPBS (2-3 vezes de 150µl cada). As células aderidas foram incubadas com cristal violeta (0,2%, 50µl/poço, 1 minuto) e novamente lavadas com DPBS (3-4 vezes de 200µl cada). As células remanescentes, marcadas com cristal violeta, foram então lisadas pela adição de Triton X-100 (0,5%, 100µl/poço) e a placa foi lida a 540nm.

Os resultados foram expressos na forma de porcentagens em relação ao controle (sem DisBa-01).

4.6. EFEITOS “IN VIVO”

Os efeitos *in vivo* da DisBa-01 na trombose e metástase de células tumorais foram realizados em colaboração com o Dr. Arnaud Bonnefoy e Alexandre Kauskot (U553-INSERM).

4.6.1. Efeito no tempo de sangramento e na trombose

O efeito da DisBa-01 no tempo de sangramento foi verificado em camundongos C57BL6 (5 semanas, aproximadamente 15 g). Os animais foram anestesiados por injeção de pentobarbital sódico (60mg/Kg, i.p.) e receberam NaCl 0,9% (n=5) ou DisBa-01 (2mg/Kg, n=5) pelo sino retro-orbital. Cinco minutos após a injeção a cauda foi seccionada à 3mm de sua extremidade e imediatamente imersa em NaCl 0,9% (37°C, Leon et al., 1999). O tempo de sangramento foi registrado até 20 minutos.

O efeito da toxina estudada foi verificado na trombose induzida pela aplicação de FeCl₃ (500 mM em agar 1%) nos vasos mesentéricos de camundongos C57Bl6/j anestesiados. A visualização dos trombos foi possível graças à injeção de rodamina 6G (1mg/ml, 50µl) pelo sino retro-orbital 10 minutos antes da aplicação do FeCl₃ e do monitoramento em microscópio de fluorescência equipado de uma câmera analógica (LHESA Electronic 400 imagens/segundo) e uma câmera digital de alta resolução (DXM1200 Nikon). A toxina (4mg/Kg) foi administrada pela mesma via que a rodamina e ao mesmo

tempo. Cada experiência de trombose foi registrada até a oclusão completa do vaso. Para os cálculos comparativos, um valor de tempo de oclusão de 60 minutos foi atribuído para os vasos não ocluídos e o teste de Mann-Whitney foi empregado para a verificação de significância.

4.6.2. Efeito na metástase de células B16F10-2B8

Células B16F10-2B8 possuem elevado poder metastático. Frequentemente em camundongos da linhagem C57BL6/j, ocorre a implantação e desenvolvimento dos focos metastáticos nos pulmões. O fato de essa linhagem expressar altos níveis de integrina $\alpha V\beta 3$ (RAY et al., 1999), tornou atraente seu emprego no modelo metastático onde a DisBa-01 deveria ser testada.

Foi utilizado um modelo isogênico de metástase utilizando células B16F10-2B8 transfectadas com o gene da luciferase e camundongos C57BL6/j. As células de melanoma, B16F10-2B8 produzem bioluminescência na presença do substrato luciferina, característica explorada para o monitoramento da metástase *in vivo*. Resumidamente, 500.000 células foram incubadas por cinco minutos na presença ou ausência da toxina (2 ou 4mg/Kg) e injetadas pela veia caudal dos animais em um volume total de 100 μ l. A evolução da implantação de metástases foi monitorada nos dias 0, 1, 4, 12 e 14 pela injeção de luciferina (150 mg/Kg).

4.7. TOXICIDADE “IN VITRO” E “IN VIVO”

Como teste preliminar de citotoxicidade *in vitro*, as células B16F10-2B8 (37°C, 5 minutos) foram submetidas às mesmas condições experimentais utilizada no ensaio de metástase *in vivo*, na ausência ou presença de DisBa-01

(25,4 μ M, ou, 50,8 μ M). Decorrido esse tempo, as células mortas foram marcadas com azul de trypan e contadas. A proporção de células mortas foi expressa em porcentagem.

Paralelamente a toxicidade da DisBa-01 foi testada em camundongos C57Bl6/j nas mesmas concentrações empregadas nos ensaios *in vivo* (2 e 4mg/Kg), observando-se a sobrevivência/morte dos animais injetados, bem como os parâmetros comportamentais em relação a camundongos que não receberam a toxina.

4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A menos que devidamente especificado, os resultados foram analisados quanto a suas significâncias utilizando-se análise de variância (ANOVA) e validados pelo pós-teste de Dunnett. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional, InStat (Graphpad InStat v.3, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.9. ESTUDOS TEÓRICOS POR BIOLOGIA ESTRUTURAL

4.9.1. Modelagem molecular

O sequenciamento do plasmídeo contendo a toxina em estudo permitiu a utilização da estrutura protéica primária deduzida em pesquisas de homologia locais utilizando o programa BLAST ("**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), restringindo a pesquisa a proteínas com estrutura resolvida e utilizando a matriz de substituição BLOSUM 62.

O alinhamento de seqüências entre a desintegrina estuda e desintegrinas com estrutura terciária resolvida foi realizada empregando-se o servidor de alinhamentos MultiAlin (<http://www.protein.toulouse.inra.fr/multialin.html>).

Para a fase de modelagem molecular baseada em homologia, foi utilizado o programa MODELLER 6v2 (SALI, 1995; SALI e BLUNDELL, 1993, <http://quitar.rockefeller.edu/modeller/>), seguindo o protocolo padrão do programa. 20 modelos foram gerados.

4.9.2. Modelagem do complexo com a integrina $\alpha V\beta 3$

Visando melhor compreender a possível ligação da toxina estuda com integrinas que reconhecem o motivo RGD, foi realizado um estudo preditivo da ligação com a integrina $\alpha V\beta 3$ em colaboração com o Dr. Carlos H.T.P. Silva (Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo; IFSC-USP). Resultados obtidos em laboratório utilizando a técnica de ligação covalente induzida por luz (*Photoaffinity Cross-linking*) entre a echistatina e essa integrina (YAHALOM, 2002) foram empregados na modelagem do complexo envolvendo a toxina em estudo.

Novamente, o programa modeller 6v2 (SALI, 1993, <http://quitar.rockefeller.edu/modeller/>) foi empregado na construção do modelo utilizando a estrutura do complexo integrina $\alpha V\beta 3$ -echistatina como molde. A estrutura molde foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Michael Chorev (Division of Bone and Mineral Research - Department of Medicine - Harvard Institutes of Medicine - Blackfan Circle - Boston, MA, E.U.A.; YAHALOM, 2002). Após a geração do modelo inicial, esse foi aprimorado pela minimização de energia de cadeias laterais de

aminoácidos que se encontravam na interface do complexo utilizando o programa Insight II.

4.9.3. Avaliação dos modelos gerados

Para a avaliação da qualidade do modelo (verificação da normalidade) foram empregados os programas WHAT IF (VRIEND et al., 1990), PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) e Verify 3D rodando localmente em estações Linux/Unix ou através do servidor (<http://biotech.embl-heidelberg.de:8400/cgi-bin/sendquery>).

5. RESULTADOS

5.1. OBTENÇÃO DE mRNAs

A extração de RNAs totais utilizando o reagente Trizol®, resultou em um produto integro (**Figura 14**) e com adequado grau de pureza (razão superior a 1,6 entre suas absorvâncias a 260nm e 280nm). O RNA total foi quantificado em 400µg.

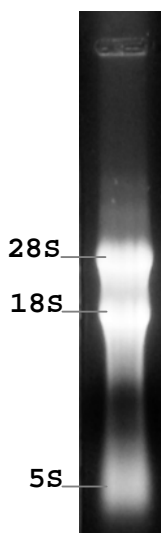


Figura 14: Análise da qualidade da amostra de RNA total por eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído. Foram aplicados 10µl da solução de RNA total obtida. Podem ser observadas as bandas correspondentes às frações de RNA ribossômico 28S, 18S e 5S.

A partir dos RNAs totais pode ser obtido 5,6µg de mRNAs purificados, representando 1,4% da amostra inicial. A quantidade obtida encontra-se de acordo com a faixa percentual esperada (entre 1 e 5%) descrita na literatura (SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T., 1989).

5.2. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNAs

A síntese de cDNAs a partir de 5µg de mRNA e suas ligações com o vetor UNIZAP XR resultaram em uma solução de DNA contendo aproximadamente 200ng/µl (Figura 15).

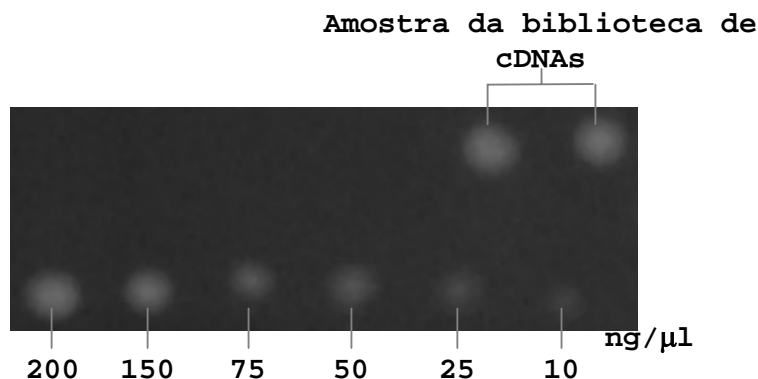


Figura 15: Quantificação aproximada dos cDNAs obtidos. Foi aplicado 1µl de cada padrão contendo concentrações conhecidas de DNA. Também foi aplicado 1µl da amostra que se desejava estimar a concentração, visível em duplicada no canto superior direito da imagem.

Um total de 4µl dos vetores UNIZAP XR recombinantes foram empacotados em bacteriófagos utilizando o *kit* ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning, resultando em um rendimento de $5,7 \times 10^6$ pfu/µg de vetor. A biblioteca amplificada de forma clonal pelos bacteriófagos resultou em solução contendo 7×10^9 pfu/ml. Adotam-se valores superiores a 10^6 pfu/µg de vetor e entre 10^9 e 10^{11} pfu/ml como referência respectivamente para o empacotamento e amplificação da biblioteca de bacteriófagos.

5.3. TRIAGEM DA BIBLIOTECA E SUBCLONAGENS

Os oligonucleotídeos F1 e R1 (Tabela 10) possibilitaram a obtenção de dois produtos de amplificação. O primeiro foi resultado da amplificação dos moldes

contidos na biblioteca de cDNAs (DisBa-01). O segundo foi obtido pela amplificação direta de mRNAs (DisBa-02).

Utilizando oligonucleotídeos iniciadores degenerados (cujas seqüências foram inspiradas em regiões conservadas N- e C-terminais de domínios desintegrina) e o RNA total extraído da glândula venenífera de um espécime de *Bothrops alternatus*, foi possível a amplificação de uma única banda com aproximadamente 220 pares de bases (Figura 16) compatível com o tamanho de desintegrinas médias.

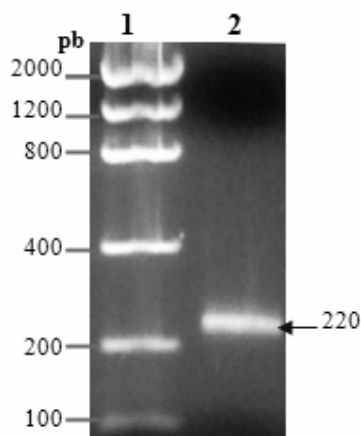


Figura 16: Amplificação de desintegrinas pela RT-PCR. 1) Marcador de baixa massa molecular; 2) Produto da amplificação utilizando os oligonucleotídeos 5F e 3R (Tabela 10).

Também foi possível a amplificação de metaloproteinase-desintegrinas utilizando-se oligonucleotídeos desenhados para regiões N- e C-terminais, conservadas nessas moléculas (Figura 17A), assim como a BaG (Cominetti et al., 2003), uma metaloproteinase-desintegrina dimérica recentemente isolada por nosso grupo (Figura 17B).

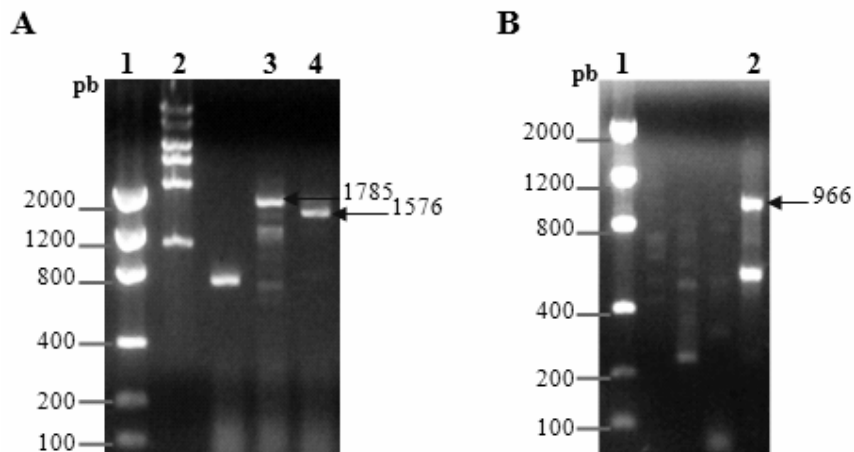


Figura 17: Amplificação de metaloproteinase-desintegrinas e da BaG pela RT-PCR. **A)** Amplificação de metaloproteinases desintegrinas: 1- Marcador de baixa massa molecular, 2- Marcador de alta massa molecular, 3- Produto da amplificação utilizando os oligonucleotídeos 4F e 4R (Tabela 10), 4- Produto da amplificação utilizando os oligonucleotídeos 4F e 3R (Tabela 10); **B)** Amplificação da BaG: 1- Marcador de baixa massa molecular, 2- Produto da amplificação utilizando os oligonucleotídeos 3F e 2R (Tabela 10).

O DNA que codifica para a *DisBa-01* foi subclonada no vetor pET28a, resultando no plasmídeo recombinante denominado p*DisBa-01*. Já a toxina *DisBa-02* foi clonada no vetor TOPO TA e o novo plasmídeo foi denominado p*DisBa-02*.

5.3.1. Análise de restrição

O p*DisBa-01* obtido foi submetido à restrição enzimática utilizando as mesmas enzimas empregadas previamente durante a recombinação de DNAs (*Bam* HI e *Eco* RI). O produto da restrição gerou, como esperado, uma banda em torno de 330pb (Figura 18).

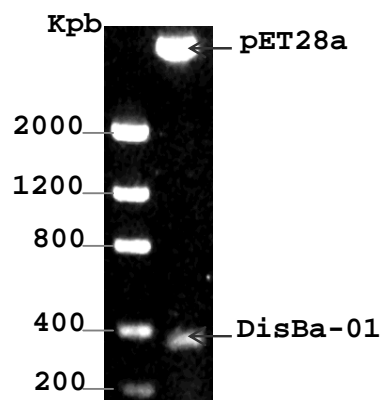


Figura 18: Análise de restrição do plasmídeo pDisBa-01. O plasmídeo recombinante foi digerido com as mesmas enzimas utilizadas durante a etapa de clonagem (*Bam* HI e *Eco* RI). A restrição propiciou a visualização de um fragmento de DNA com tamanho esperado quando submetido à eletroforese.

5.3.2. Sequenciamento automático de DNA

O sequenciamento do DNA utilizando como molde o plasmídeo pDisBa-01 e oligonucleotídeos iniciadores específicos para o vetor pET28a (T7 promotor e T7 terminador, Tabela 10) permitiu constatar que a recombinação ocorreu na fase de leitura correta. A seqüência obtida pode ser visualizada abaixo (Figura 19, Genbank accession number: [AAO75107](#)), assim como um multialinhamento com algumas desintegrinas já caracterizadas e descritas na literatura (Figura 20).

A

		▶ <i>pET28a fusion peptide</i>															
1	1	ATG	GGC	AGC	AGC	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAC	AGC	AGC	GGC	CTG	GTG	45
		M	G	S	S	H	H	H	H	H	H	S	S	G	L	V	15
46	16	CCG	CGC	GGC	AGC	CAT	ATG	GCT	AGC	ATG	ACT	GGT	GGA	CAG	CAA	ATG	90
		P	R	G	S	H	M	A	S	M	T	G	G	Q	Q	M	30
91	31	GGT	CGC	GGA	TCC	GGA	AAT	GAA	CTT	TTG	GAG	GCG	GGA	GAA	GAA	TGT	135
		G	R	G	S	G	N	E	L	L	E	A	G	E	E	C	45
136	46	GAC	TGT	GGC	ACT	CCT	GGA	AAT	CCG	TGC	TGC	GAT	GCT	GCA	ACC	TGT	180
		D	C	G	T	P	G	N	P	C	C	D	A	A	T	C	60
181	61	AAA	CTG	AGA	CCA	GGG	GCG	CAG	TGT	GCA	GAA	GGA	CTG	TGT	TGT	GAC	225
		K	L	R	P	G	A	Q	C	A	E	G	L	C	C	D	75
226	76	CAG	TGC	AGA	TTT	ATG	AAA	GAA	GGA	ACA	GTA	TGC	CGG	ATT	GCA	AGG	270
		Q	C	R	F	M	K	E	G	T	V	C	R	I	A	R	90
271	91	GGT	GAT	GAC	ATG	GAT	GAT	TAC	TGC	AAT	GGC	ATA	TCT	GCT	GGC	TGT	315
		G	D	D	M	D	D	Y	C	N	G	I	S	A	G	C	105
316	106	CCC	AGA	AAT	CCC	TTC	CAT	GCC	TAA								339
		P	R	N	P	F	H	A	*								112

B

ACLD	1772	CAAAATGTGA	AGATGGAAAG	GTCTGCAGCA	ACGGGCATTG	TGTTGATGTG	1821										
	+1	K	C	E	D	G	K	V	C	S	N	G	H	C	V	D	V
DisBa-01	340	.C..CAA..GA...G..	389										
	+3	N	N	G	R	Q	
ACLD	1822	AATATAGCCT	ACAAATCAAC	TACTGGCTTC	TCTCAGATTT	GA	1863										
	+1	N	I	A	Y	K	S	T	T	G	F	S	Q	I	#		
DisBa-01	390	C..C.....	.AT.....	CT.....	431										
	+3	T	T	.	#	#	.	.	S		

Figura 19: Sequência de nucleotídeos e de resíduos de aminoácido deduzido a partir do pDisBa-01. **A)** O motivo RGD e os códons correspondentes são representados em fundo cinza. O códon de parada é representado por um “*”. **B)** Comparação da sequência de nucleotídeos e resíduos de aminoácido (fundo cinza) entre a ACLD e a região não traduzida da DisBa-01 amplificada pela PCR. “+1” e “+3” representam a fase de leitura da sequência. A numeração da sequência de nucleotídeos da DisBa-01 é uma continuação daquela encontrada em A. Resíduos idênticos são representados por “.”.

		10	20	30	40	50
DisBa-01	1
Halystatin	1S.....Q.....K..
Bothrostatin	1	SGKNFG.....V.....
Trigramin	1D.....S.A.....I.....G.....S.IE.....
Flavoridin	1	...F.....S.S.....D.....K.KR.....
Contortrostatin	1T.....	S.FDA.A.....TT.....	.S.....D.....	...K.....
Echistatin	1	-----	-----	-----	---.ES.P..	RN.K.L.....
Salmosin1	1	-----S.....Q.....

		60	70	80
DisBa-01	51
Halystatin	51
Bothrostatin	51	...R.....
Trigramin	51L.....R.....
Flavoridin	51	I.....FP.....	..R.T.L.ND.....
Contortrostatin	51	...R.....L.....
Echistatin	19	I.KR.....KTCD.....HKGPA T
Salmosin1	46	I..R.....L.....

Figura 20: Multialinhamento de seqüências de desintegrinas RGD: O motivo RGD é representado em negrito. Resíduos idênticos aos encontrados na DisBa-01 são representados por "." e deleções por "-".

O pDisBa-02 também foi submetido ao sequenciamento automático. O resultado mostra a subclonagem dos domínios tipo-desintegrina e rico em cisteínas, provavelmente provenientes de uma SVMPs de classe P-III. A seqüência obtida (Figura 21) exibe elevada homologia com a ACLD (Genbank accession number: [AAC18911](#)), uma SVMP de *Agkistrodon contortrix laticinctus* pertencente à classe P-III. O alinhamento de seqüências indica apenas duas substituições entre as seqüências, uma em cada domínio.

► Tipo-desintegrina

1	GGA	GAA	GAA	TGT	GAC	TGT	GGC	TCT	CCT	ACA	AAT	TGT	CAA	AAT	CCG	45
1	G	E	E	C	D	C	G	S	P	T	N	C	Q	N	P	15
46	TGC	TGC	GAT	GCT	GCA	ACG	TGT	AAA	CTG	ACA	CCA	GGG	TCA	CAG	TGT	90
16	C	C	D	A	A	T	C	K	L	T	P	G	S	Q	C	30
91	GCA	GAT	GGT	GTG	TGT	TGT	GAC	CAG	TGC	AGA	TTT	ACG	AGA	GCA	GGA	135
31	A	D	G	V	C	C	D	Q	C	R	F	T	R	A	G	45
136	ACA	GAA	TGT	CGG	GCA	GCA	AAG	GAT	GAC	TGT	GAC	ATG	GCT	GAT	CTC	180
46	T	E	C	R	<u>A</u>	A	K	D	D	C	D	M	A	D	L	60

```

181 TGC ACT GGC CAA TCT GCT GAG TGT CCC ACG GAT CGC TTC CAA AGG 225
61 C T G Q S A E C P T D R F Q R 75
226 AAT GGA CAC CCA TGC CTA AAC GAC AAT GGT TAC TGC TAC AAT CGG 270
76 N G H P C L N D N G Y C Y N R 90
271 ACG TGC CCC ACC CTG AAG AAC CAA TGT ATT TAT TTC TTT GGG CCA 315
91 T C P T L K N Q C I Y F F G P 105
316 AAT GCA GCC GTG GCT AAA GAT TCA TGT TTC AAA GGT AAC CAG AAA 360
106 N A A V A K D S C F K G N Q K 120
361 AGC AAT AAT CAT ACC TAC TGC AGA AAG GAA AAT GGT AAA AAG ATT 405
121 S N N H T Y C R K E N G K K I 135
406 CCA TGT GCA CCA CAA GAT ATA AAA TGT GGC AGG TTA TAC TGC TTT 450
136 P C A P Q D I K C G R L Y C F 150
451 CGT AAT TTA CCC GGA AAG AAG AAT ATT TGC AGT GTC ATA TAT ACA 495
151 R N L P G K K N I C S V I Y T 165

496 CCC ACA GAT GAA GAT ATT AGG ATG GTT CTT CCT GGA ACA AAA TGT 540
166 P T D E D I R M V L P G T K C 180

541 GAA GAT GGA AAG GTC TGC AGC AAC GGG CAT TGT GTT GAT GTG AAT 585
181 E D G K V C S N G H C V D V N 195

586 ATA GCC TAC AAA TCA ACT ACT GGA TTC TCT CAG ATA TAA 624
196 I A Y K S T T G F S Q I * 207

```

Figura 21: Sequência de nucleotídeos e de resíduos de aminoácido deduzidas a partir do pDisBa-02. O motivo “DCD” comumente observado em domínios tipo-desintegrina é representado em negrito. Todos os resíduos são idênticos aos encontrados na ACLD (Genbank accession number: [AAC18911](#)), exceto pelos resíduos Ala⁷² e Arg¹⁷² (sublinhados e em itálico) que são substituídos, respectivamente, pelos resíduos de Gln e Gly. O códon de parada é representado por um “*”.

5.4. CARACTERIZAÇÕES BIOQUÍMICAS E CELULARES

5.4.1. Expressão e solubilidade

Após a transformação de cepas da linhagem BL21(DE3) de *Escherichia coli* utilizando o plasmídeo pDisBa-01, foram realizados ensaios de expressão e solubilidade que se mostraram praticamente inalterados nas temperaturas testadas (30°C e 37°C). Foi possível constatar a expressão de uma banda em próxima de 12kDa após a indução com IPTG (Figura 22). A proteína encontrava-se

principalmente em corpos de inclusão, porém passível de recuperação através da desnaturação utilizando agentes caotrópicos.

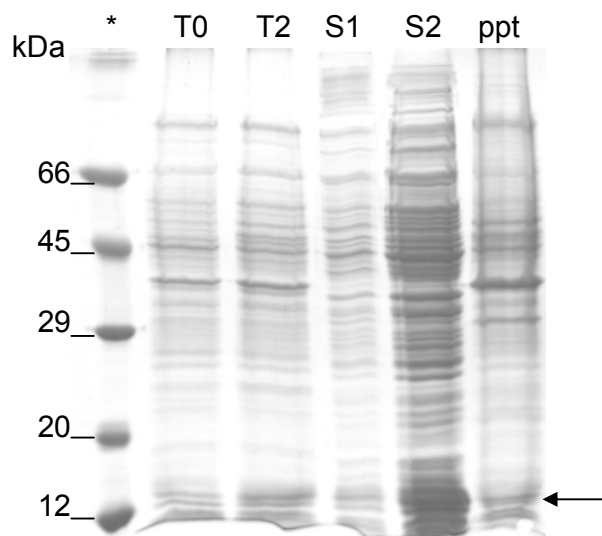


Figura 22: Expressão heteróloga da DisBa-01 utilizando a linhagem BL21(DE3) de *Escherichia coli* analisada por SDS-PAGE 15%. * Benchmark Protein Ladder; T0: extrato bacteriano obtido antes da indução com IPTG; T2: extrato bacteriano obtido 2 horas após a indução; S1: sobrenadante obtido em condições não desnaturante; S2: sobrenadante obtido em condições desnaturante utilizando 6M de Uréia; ppt: amostra do corpo de inclusão não solubilizado em uréia. A banda que contém a proteína de interesse é indicada por uma seta.

5.4.2. Purificação

A fração desnaturante (S2) contendo a proteína de interesse, expressa em fusão com um peptídeo N-terminal portador de seis resíduos consecutivos de histidina, foi submetido à purificação através de cromatografia de afinidade em resina de níquel em condições desnaturantes.

As frações obtidas com a eluição das proteínas utilizando 1M de Imidazol (Figura 23) revelaram a purificação parcial da proteína de interesse.

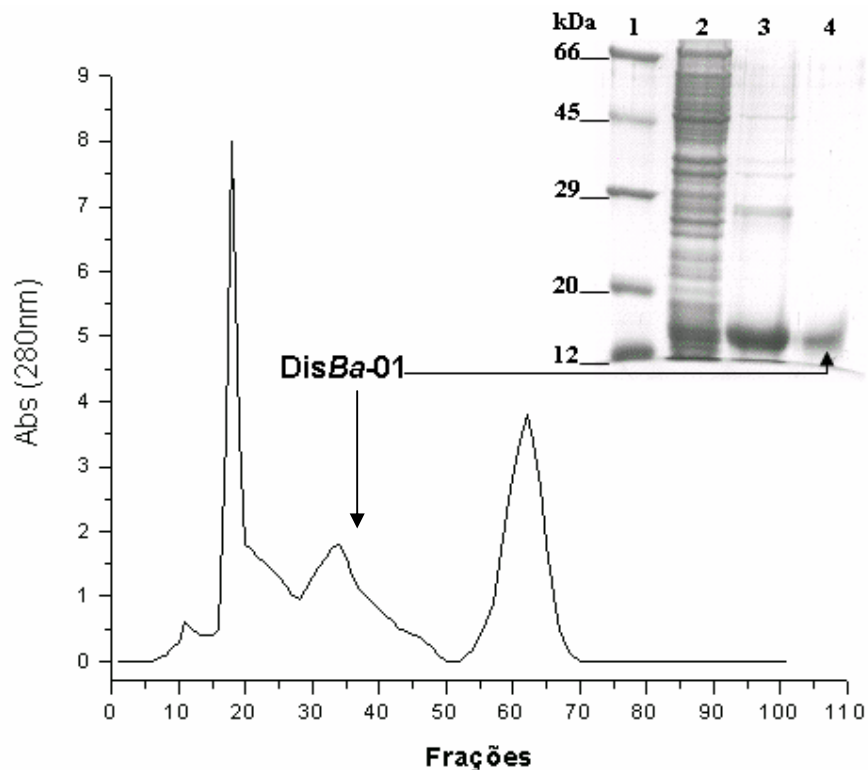


Figura 23: Purificação de frações eluídas da resina de Ni-NTA por gel filtração (Sephadex G-75). É exibido o perfil cromatográfico consistentemente obtido durante a filtração em gel. A figura inserida representa diferentes etapas da purificação analisadas por SDS-PAGE 15%. 1) Marcador de massa molecular, 2) S2, 3) Mistura de frações parcialmente purificadas obtidas pela cromatografia de afinidade, 4) Mistura de frações obtidas por gel filtração.

As amostras eluídas do processo cromatográfico por gel filtração também foram analisadas em géis de tricina (com maior poder de resolução para proteínas de pequena massa molecular quando comparada a SDS-PAGE). O resultado evidencia a presença de uma banda minoritária acima da banda referente à toxina de interesse (**Figura 24**) que não pode ser detectada utilizando SDS-PAGE.

A comparação com frações eluídas da cromatografia de afinidade sugere que a banda minoritária surja após a remoção do agente desnaturante (Uréia 6M).

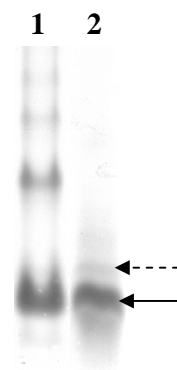


Figura 24: Análise de frações obtidas por gel filtração (Sephadex G-75) em gel de tricina. 1) Mistura de frações obtidas em cromatografia de afinidade em resina contendo Ni-NTA; 2) Mistura de frações obtidas no processo de gel filtração. A seta pontilhada indica a banda minoritária presente na amostra. A seta não pontilhada representa a banda correspondente à toxina de interesse.

As frações eluídas da cromatografia por gel filtração que apresentavam maior homogeneidade foram submetidas à HPLC por interações hidrofóbicas (coluna C-8). O resultado (**Figura 25**) mostra um pico principal de absorvância a 280nm. A pequena absorvância dos picos pode ser explicada pela baixa densidade de resíduos aromáticos (0 Trp, 1 Tyr, 2 Phe por molécula). A absorvância de 1mg/ml da proteína heteróloga foi estimado em 170mAbs (ProtParam Tools; GURUPRASAD, REDDY E PANDIT 1990; IKAI, 1980; KYTE, 1982; <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

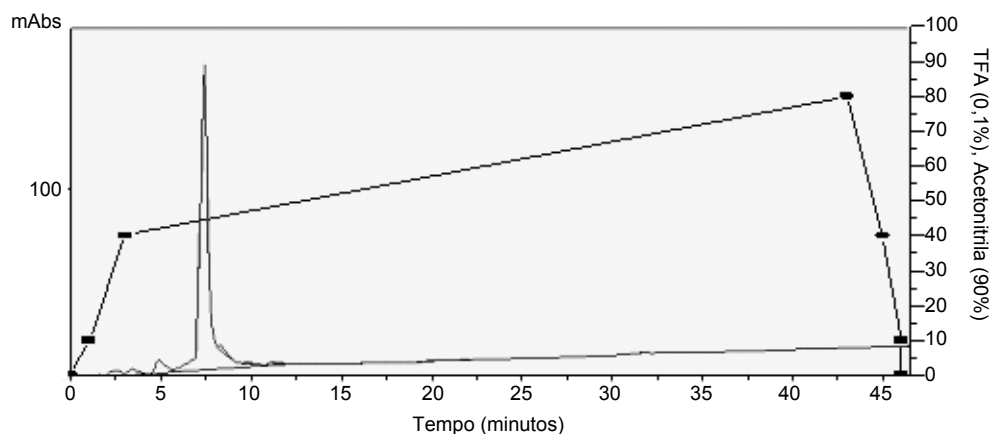


Figura 25: Cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) por interação hidrofóbica em coluna C8. O monitoramento óptico a 280nm mostra um pico de absorvância. Tampão A (0,1% TFA), Tampão B (0,1% TFA, 90% Acetonitrila).

5.4.3. Caracterização de integrinas por FACS

Algumas integrinas presentes na superfície celular foram sondadas com o uso de anticorpos específicos. Dentre as células empregadas neste trabalho, apenas as células B16F10-2B8 não puderam ser analisadas por FACS pelo fato de já possuírem fluorescência intrínseca. O conteúdo de integrinas $\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$ presentes em células MDA-MB-231 e HMEC-1 pode ser observado abaixo (Figura 26).

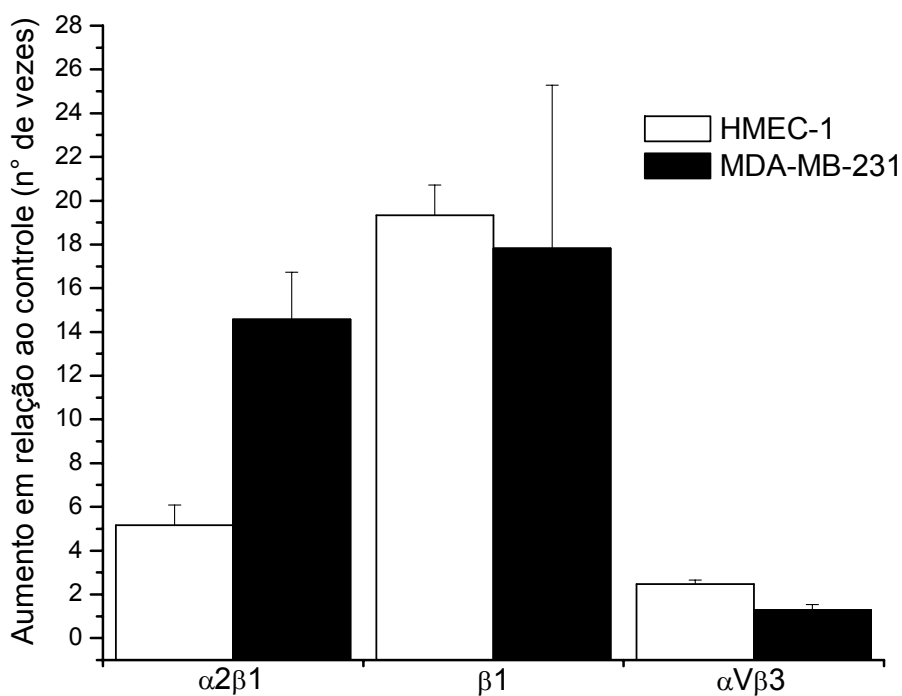


Figura 26: Caracterização de integrinas de superfície por citometria de fluxo. Observa-se uma maior ocorrência de integrinas $\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$ nas células endoteliais HMEC-1 quando comparada com a linhagem MDA-MB-231 (câncer de mama). Contudo, o conteúdo de integrinas $\alpha 2\beta 1$ é maior na linhagem MDA-MB-231 que em HMEC-1.

5.5. EFEITOS “IN VITRO”

5.5.1. Efeito na agregação plaquetária

Os efeitos da DisBa-01 na agregação plaquetária utilizando PRP de coelho e humano foram realizados em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Russolina B. Zingali (UFRJ), enquanto que os efeitos na agregação de plaquetas lavadas de camundongo e ensaios de competição direta pela integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ foram realizados em colaboração com o grupo do Dr. Arnaud Bonnefoy (INSERM – França), conforme previamente descrito.

Os resultados sugerem forte inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno ($\text{IC}_{50}=235\text{nM}$; **Figura 27**) e por ADP ($\text{IC}_{50}=124\text{nM}$; **Figura 28**) em PRP de coelho.

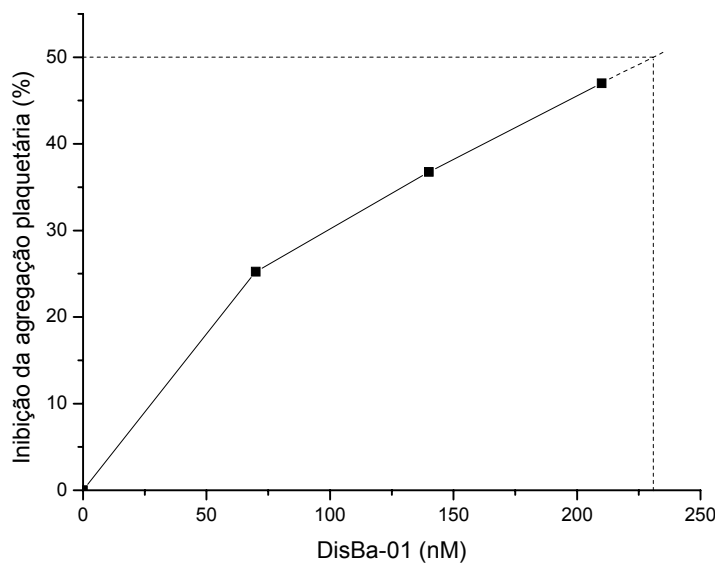


Figura 27: Efeito da DisBa-01 na agregação plaquetária induzida por colágeno (0,0025%) em PRP de coelho. O IC_{50} foi estimado em 235nM.

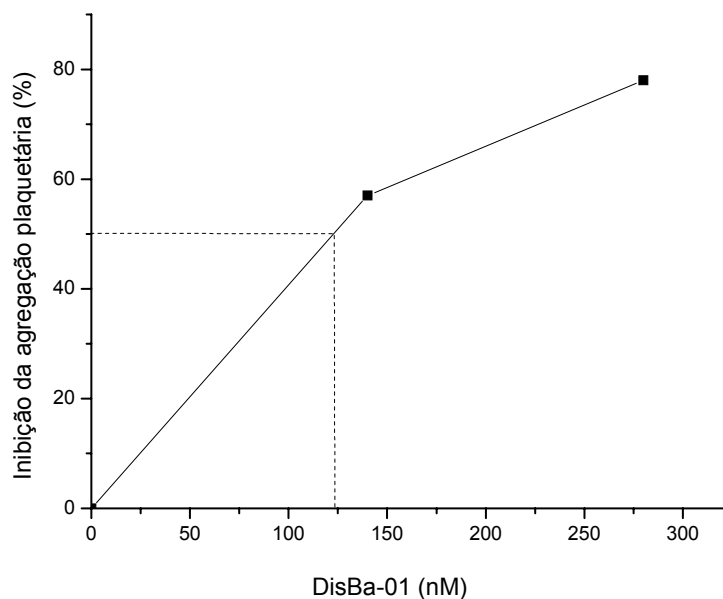


Figura 28: Efeito da DisBa-01 na agregação plaquetária induzida por ADP (5 μM) em PRP de coelho. O IC₅₀ foi estimado em 124 nM.

Os valores de IC₅₀ são comparáveis ao de desintegrinas purificadas a partir do veneno, indicando que a DisBa-01 expressa em bactérias foi obtida em uma conformação ativa. O fato dos IC₅₀s para a agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP serem relativamente próximos sugere que a inibição ocorra através da ligação com a integrina α IIb β 3, impedindo a ligação com o fibrinogênio, necessária para que ocorra a agregação.

Com metodologia similar foi testado o efeito da DisBa-01 na agregação plaquetária induzida por ADP (10 μM) em PRP humano (Figura 29). O IC₅₀ foi estimado em 475 nM.

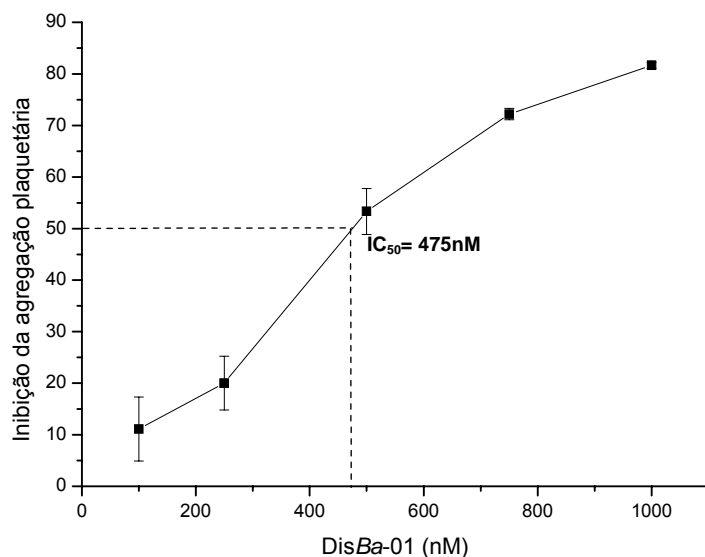


Figura 29: Efeito da DisBa-01 na agregação plaquetária induzida por ADP (10 μ M) em PRP humano. O IC₅₀ foi estimado em 475nM.

Foi testado ainda o efeito da toxina na agregação de plaquetas lavadas de camundongos C57BL6/j. Os resultados permitem constatar um efeito inibitório já perceptível na concentração de 1nM. O IC₅₀ foi estimado em 25nM (Figura 30).

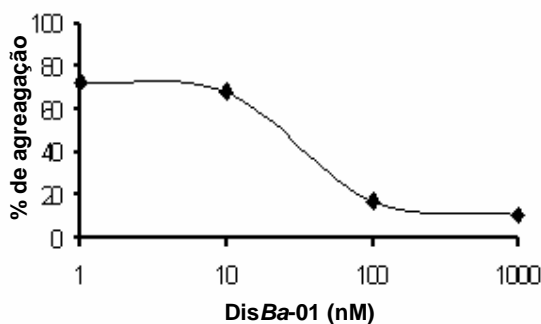


Figura 30: Efeito da DisBa-01 na agregação de plaquetas lavadas de camundongos. O IC₅₀ foi estimado em 25nM.

O conjunto de resultados acima sugerem fortemente o bloqueio da integrina α IIb β 3 de plaquetas pela DisBa-01. Evidências mais diretas para a

ligação a esta integrina foram explorados por citometria de fluxo (FACS). A técnica foi empregada para mensurar o deslocamento de fibrinogênio-FITC (Fg-FITC) ou do anticorpo que se liga especificamente a forma ativada dessa integrina (PAC-1-FITC) da superfície de plaquetas lavadas. Os resultados permitem estimar um IC_{50} de 18nM para a ligação de Fg-FITC (Figura 31A) e de 70nM para a ligação com PAC-1-FITC (Figura 31B).

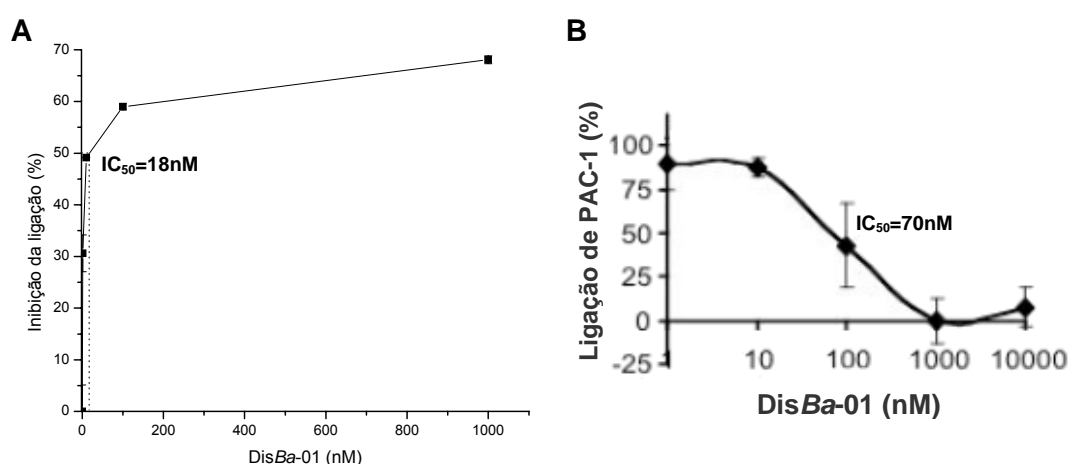


Figura 31: Ensaio de competição entre a DisBa-01 e ligantes da integrina $\alpha IIb\beta 3$ ativada de plaquetas. **A)** Deslocamento da ligação de Fg-FITC. **B)** Deslocamento da ligação de anticorpo anti-integrina $\alpha IIb\beta 3$ ativada pela DisBa-01. Valores obtidos por citometria de fluxo.

5.5.2. Efeito na proliferação celular

O efeito da toxina, DisBa-01, na proliferação de células MDA-MB-231, HMEC-1, e B16F10-2B8 foi testado (2.5×10^4 /poço) durante os tempos de 24, 48 ou 72 horas. Depois desse período os poços foram lavados duas vezes com PBS e foi adicionado meio fresco contendo XTT (150 μ l). Depois de 4 horas de incubação a placa foi lida a 450 e 620nm. Os valores a 620nm foram subtraídos dos obtidos a 450nm para cada poço e expressos como porcentagens dos valores do controle (Figuras 32 a 34).

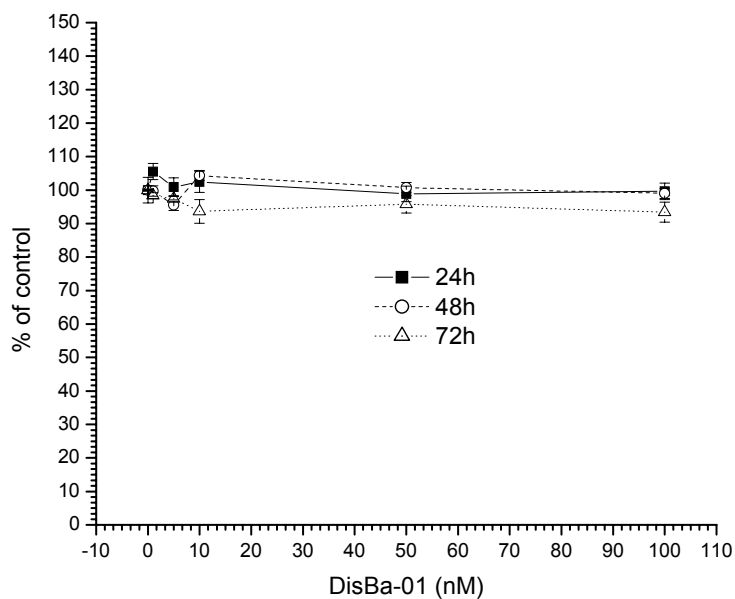


Figura 32: Efeito da DisBa-01 na proliferação de células MD-MB-231. Nas concentrações testadas, não houve efeito significativo na proliferação das células de tumor mamário.

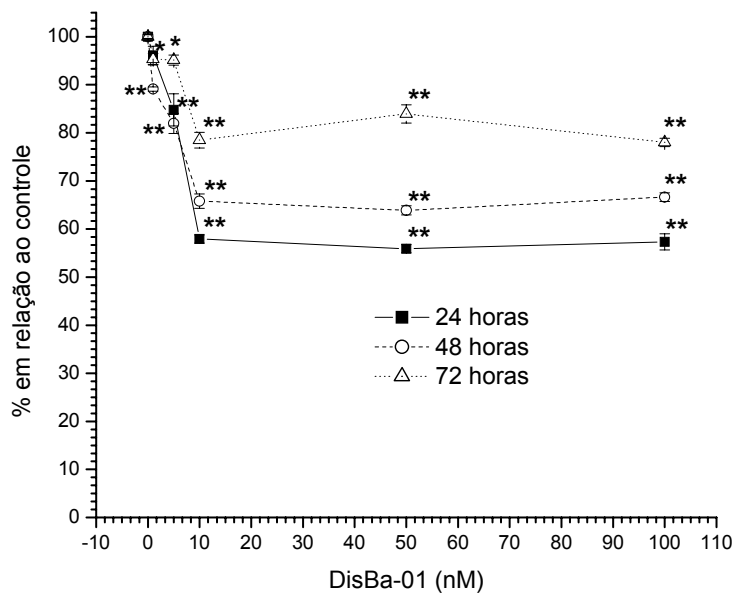


Figura 33: Efeito da DisBa-01 na proliferação de células HMEC-1. Todas as concentrações testadas inibiram significativamente a proliferação das células endoteliais em todos os tempos analisados, exceto no caso da concentração de 1nM para o tempo de 24 horas.

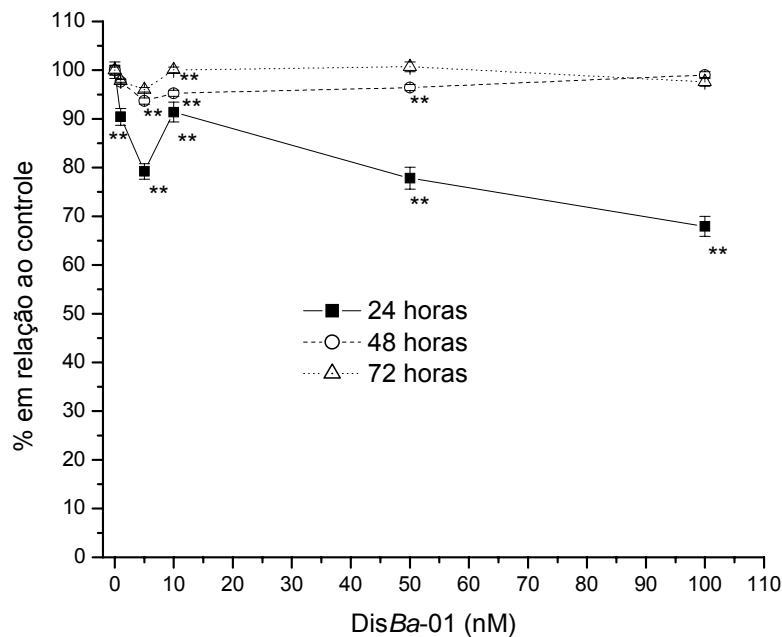


Figura 34: Efeito da DisBa-01 na proliferação de células B16F10-2B8. Todas as concentrações testadas inibiram significativamente a proliferação das células de melanoma decorridas 24 horas de incubação. Para a incubação de 48 horas, apenas as concentrações de 5, 10 e 50nM inibiram significativamente a proliferação dessas células. Para a incubação de 72 horas apenas a concentração de 5nM foi significante ao inibir a proliferação celular.

5.5.3. Efeito na adesão de células B16F10-2B8 à vitronectina

Com o intuito de sondar a ligação de toxina em estudo à integrina $\alpha V\beta 3$ foram conduzidos ensaios de inibição da adesão de células B16F10-2B8 a um conhecido ligante desse receptor, a vitronectina ($1\mu\text{g}/\text{poço}$). Diversas concentrações da toxina foram utilizadas (0, 10, 100, 1000nM) e os resultados sugerem forte inibição da ligação dessas células à vitronectina ($IC_{50}=225\text{nM}$, **Figura 35**).

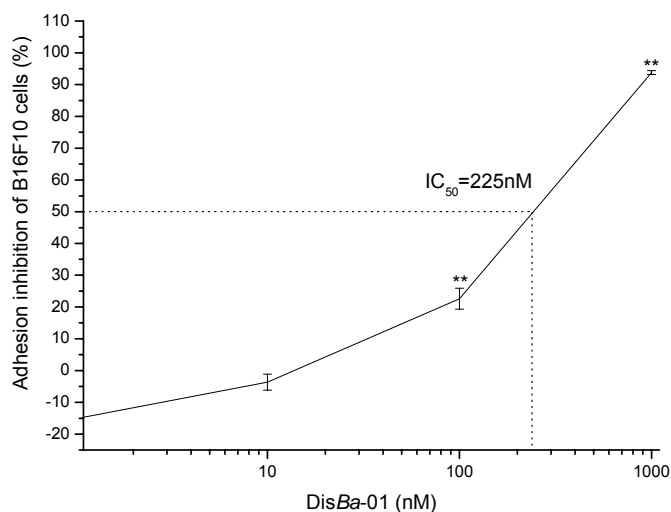


Figura 35: Inibição da adesão de células B16F10-2B8 à vitronectina pela DisBa-01. O IC₅₀ para a inibição das células ao ligante imobilizado (1µg/poço) foi estimado em 225nM.

5.6. EFEITOS “IN VIVO”

5.6.1. Efeito no tempo de sangramento e na trombose

Ainda para averiguar o potencial de utilização da DisBa-01 contra a trombose e somando-se aos resultados *in vitro*, também foi verificado o efeito da DisBa-01 na trombose induzida *in vivo* pela aplicação de FeCl₃-agar em vasos mesentéricos de camundongos C57BL6/j. Os resultados (Figuras 36 e 37) indicam que na concentração 4mg/Kg, a toxina injetada pelo sino retro-orbital 10 minutos antes da lesão prolonga de maneira significativa o tempo de oclusão trombótica nas arteríolas (Experimental = 58,4 ± 1,6 min; Controle = 24,3 ± 2,8 min, p<0,002) e vênulas (Experimental = 46,6 ± 6,8min.; Controle = 27,1 ± 1,3min., p<0,002). P calculado pelo teste de Mann-Whitney.

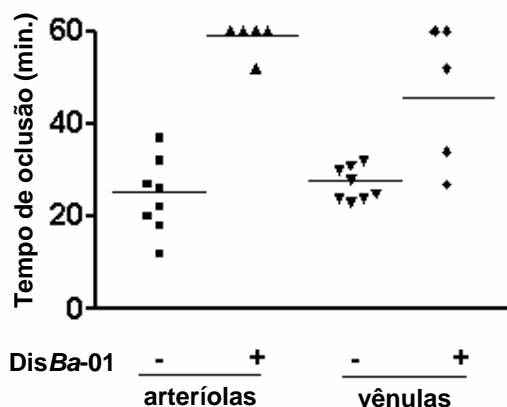


Figura 36: Efeito da DisBa-01 na trombose experimental induzida por FeCl₃ (500mM) em agar (1%). O tempo de oclusão em presença “+” ou ausência “-” de DisBa-01 (4mg/kg) nas arteríolas e vênulas mesentéricas é representado em minutos.

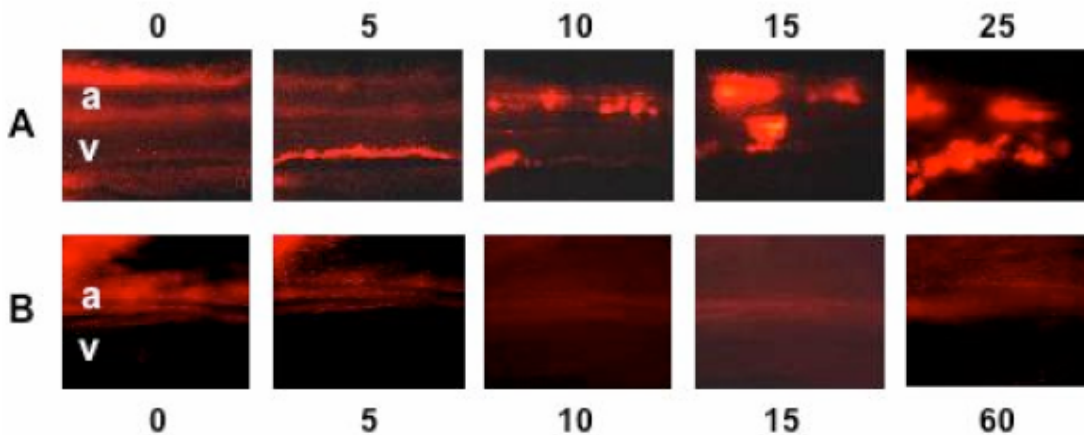


Figura 37: Evolução da trombose induzida por FeCl₃ em arteríolas (a) e vênulas (v) mesentéricas de camundongos. **A)** Na ausência de DisBa-01 (de 0 a 25 min); **B)** Na presença de DisBa-01 (4mg/Kg; de 0 a 60 min). Nenhuma oclusão observável.

Também foi observado um aumento significativo no tempo de sangramento (DisBa-01: 989 ± 140 segundos, NaCl 0,9%: 202 ± 22 segundos; p<0,008) entre o grupos tratados com DisBa-01 (2mg/Kg) e NaCl 0,9% (Figura 37). Entre os cinco animais do grupo tratado pela desintegrina, três exibiram tempo de sangramento superior a 20 minutos. Nesse caso adotou-se esse tempo para os cálculos.

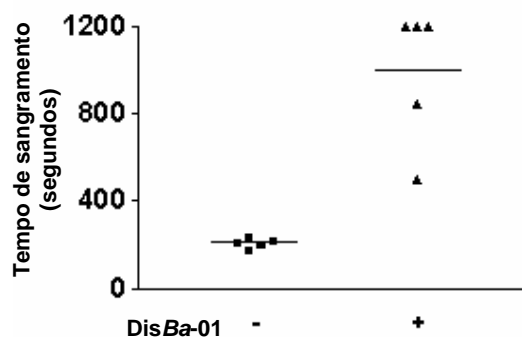


Figura 38: Prolongamento do tempo de sangramento pela DisBa-01. O tempo é representado em segundos na presença ou ausência da toxina (2mg/Kg).

5.6.2. Efeito na metástase tumoral de células B16F10-2B8

Para verificar o potencial antimetastático da DisBa-01 foi utilizado um modelo isogênico de metástase *in vivo* utilizando a injeção de células B16F10-2B8 em camundongos C57BL6/j. As células utilizadas foram transfectadas com o gene da luciferase, enzima que na presença de luciferina produz luz.

Neste modelo a toxina foi aplicada em um único momento, concomitantemente com a injeção das células (5×10^5). Após injeções de luciferina, as bioluminescências resultantes foram registradas em diversos tempos (0, 1, 4, 7, 12 e 14 dias; **Figura 39**).

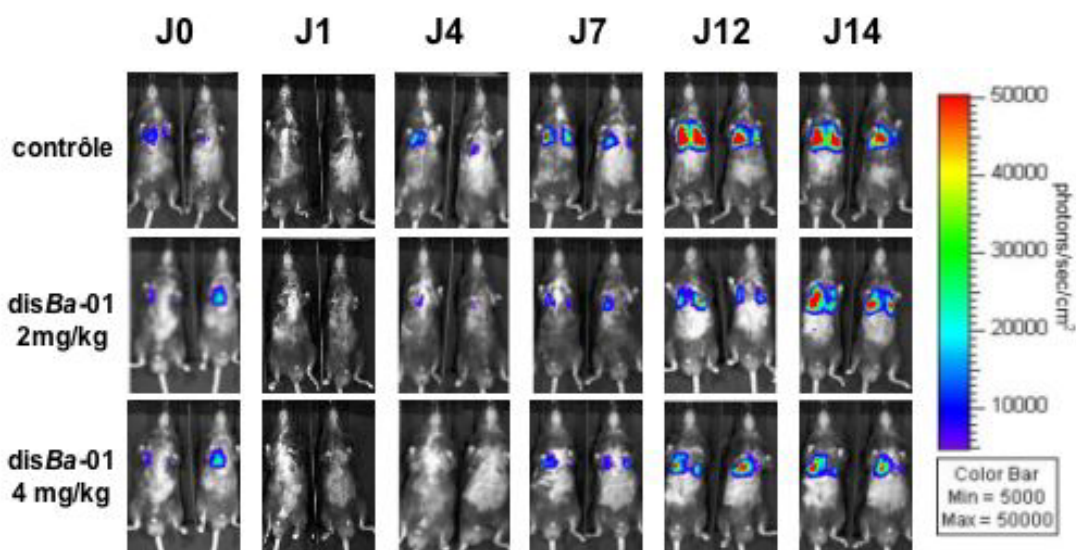


Figura 39: Monitoramento do sinal de bioluminescência após a aplicação de luciferina. As imagens foram obtidas de camundongos que receberam células B16F10-2B8 na presença ou ausência de *DisBa-01*. O monitoramento foi realizado durante os dias 0 (J0), 1 (J1), 4 (J4), 7 (J7), 12 (J12) e 14 (J14).

As curvas das bioluminescências observadas entre o grupo não tratado e tratado mostram uma inibição da expansão das metástases pela *DisBa-01*. Esta inibição foi significativa no sétimo e décimo - segundo dia para ambas as doses testadas (**Figura 40**). Entre as doses empregadas não houve diferença estatística.

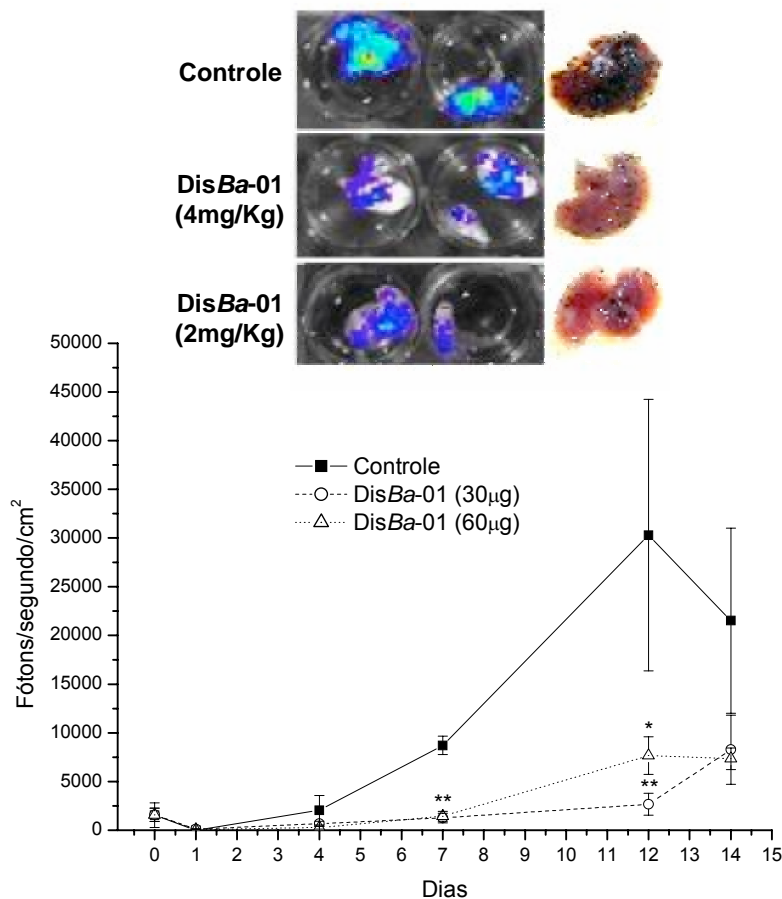


Figura 40: Efeito da administração única da DisBa-01 na implantação e desenvolvimento de metástases pulmonares de células B16F10-2B8 em modelo isogênico. O gráfico mostra a evolução do sinal luminoso emitido com o passar do tempo para o controle, DisBa-01 2 e 4mg/Kg. As fotos acima foram tiradas de pulmões dos animais submetidos ao experimento através de câmera para a detecção da emissão de fótons (esquerda) e câmera convencional (direita).

Ao fim do experimento, os animais foram mortos e seus pulmões analisados histologicamente (*"Laboratoire d'Histologie JL Salzmann"*, Bobigny, Université Paris 13) através da coloração de Masson e Hematoxilina-eosina. A análise confirma a diminuição do número e tamanho dos nódulos após o tratamento com a toxina (2 mg/kg) (Figura 41).

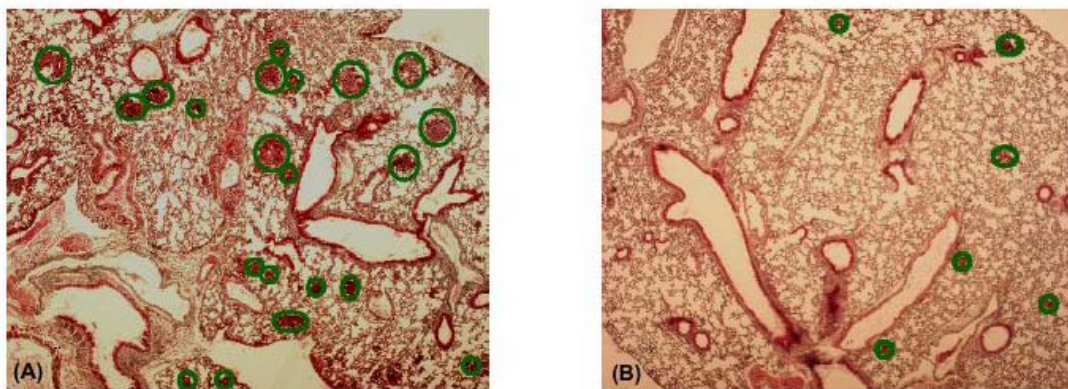


Figura 41: Análise histológica de pulmões dos camundongos submetidos ao ensaio de metástase *in vivo* (aumento de 40x). **A)** Pulmão de animal que não foi tratada pela DisBa-01; **B)** Pulmão de animal que recebeu administração única de DisBa-01 (2 mg/kg). Os módulos metastáticos são circulos em verde.

5.7. TOXICIDADE “IN VITRO” E “IN VIVO”

Tendo-se em conta que os efeitos observados *in vitro* e *in vivo* poderiam ser provenientes de efeitos tóxicos primários, foram realizados ensaios preliminares de citotoxicidade e toxicidade *in vivo*. No que diz respeito à citotoxicidade, células B16F10-2B8 foram submetidas às mesmas condições utilizadas no experimento de metástase *in vivo*, ou seja, na presença de DisBa-01 (25,4 μ M ou 50,8 μ M) ou na sua ausência (controle). Após cinco minutos, as células mortas foram marcadas com Trypan Blue e contadas. A média e o erro padrão de três experimentos independentes foram expressos como porcentagem de células mortas (Figura 42). Não foi observada diferença significativa entre as células submetidas à presença da toxina quando comparada a células controle.

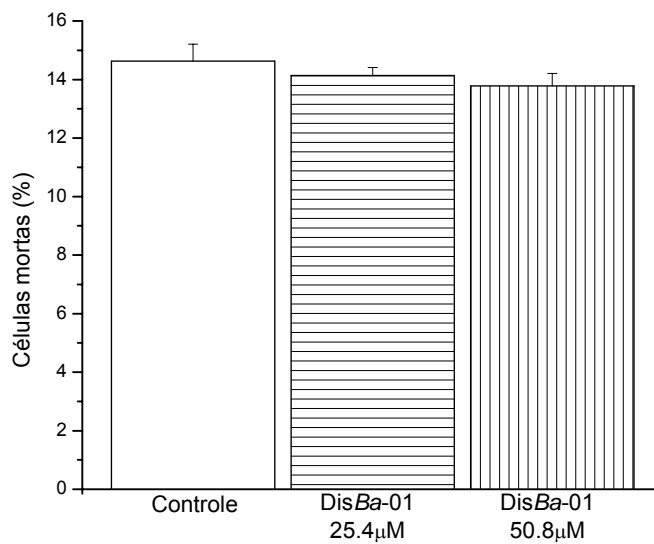


Figura 42: Teste de citotoxicidade fatal aguda em células B16F10-2B8. Foram utilizadas condições comparáveis às utilizadas no ensaio de inibição da formação de metástases, onde 25,4µM correspondem à 2mg/Kg e 50,8µM à 4mg/Kg.

Nenhum evento fatal ou alteração comportamental foi observado pela administração da toxina nas conduções utilizadas para as experimentações *in vivo* (comunicação pessoal realizada por Alexandre Kauskot – U553 – INSERM).

5.8. ESTUDOS TEÓRICOS POR BIOLOGIA ESTRUTURAL

5.8.1. Modelagem molecular da DisBa-01

Através de um processo de modelagem molecular baseado em homologia, foi construído um modelo para estrutura tridimensional da DisBa-01 (Figura 43; arquivo gravado no CD) baseando-se na seqüência deduzida a partir de seu cDNA. Foi utilizada como modelo a estrutura da Trimestatina ([1J2L](#)) e Flavoridina ([1FVL](#)), resolvida por NMR. O alinhamento de seqüências revelou, respectivamente, 80%

e 78% de identidades. Os pareamentos positivos, idênticos ou conservativos, foram de 86% para ambos os moldes.

O alinhamento utilizado no processo de modelagem pode ser observado abaixo (Figura 43)

		10	20	30	40	50
Trimestatina	1	GEECDGSPS	NPCCDAATCK	LRPGAQCADG	LCCDQCRFKK	KRTICRIARG
Flavoridina	1	GEECDGSPS	NPCCDAATCK	LRPGAQCADG	LCCDQCRFKK	KRTICRIARG
DisBa-01	1	GEECDGTPG	NPCCDAATCK	LRPGAQCAEG	LCCDQCRFMK	EGTVCRIARG
		60	70			
Trimestatina	51	DFPDDRCTGQ	SADCPRWN~~			
Flavoridina	51	DFPDDRCTGL	SND CPRWIDL			
DisBa-01	51	DDMDYCNGL	SAGCPRNPFH			

Figura 43: Alinhamento de seqüências envolvendo os moldes utilizados, Trimestatina (1J2L) e Flavoridina (1FVL), e a DisBa-01.

Como pode ser observado no modelo (Figura 44), supõe-se a presença de seis pontes de dissulfeto na estrutura da DisBa-01, característicos de desintegrinas classificadas como médias.

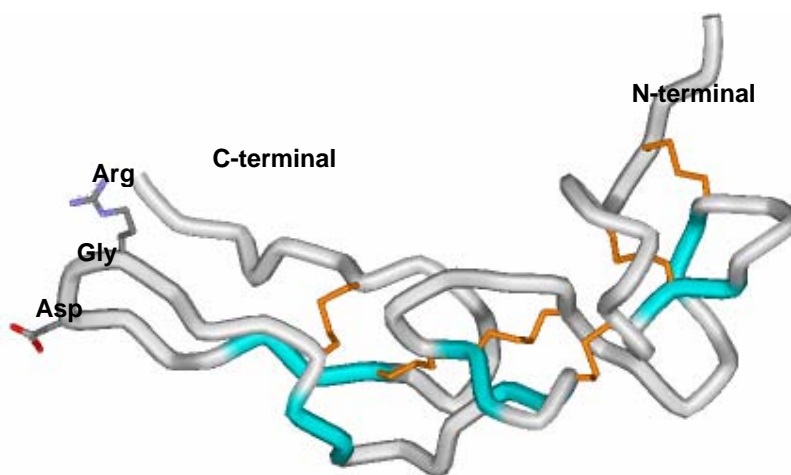


Figura 44: Modelo estrutural da DisBa-01. A forma geral da estrutura prevista é alongada. Observa-se a ocorrência de seis pontes de dissulfeto inerentes a desintegrinas médias (laranja). O motivo RGD é representado em canudos por coloração de átomos (N: Azul, C: Cinza, O: Vermelho). Foram modelados 3 pequenas folhas β compostas por duas fitas cada (representadas em azul). O modelo foi gerado utilizando o software Modeller 6v2. A imagem foi gerada com o software WebLab Viewer Pro 3.5.

A toxina possui estrutura alongada, conforme previamente descrito para outros membro do grupo (Figura 45).

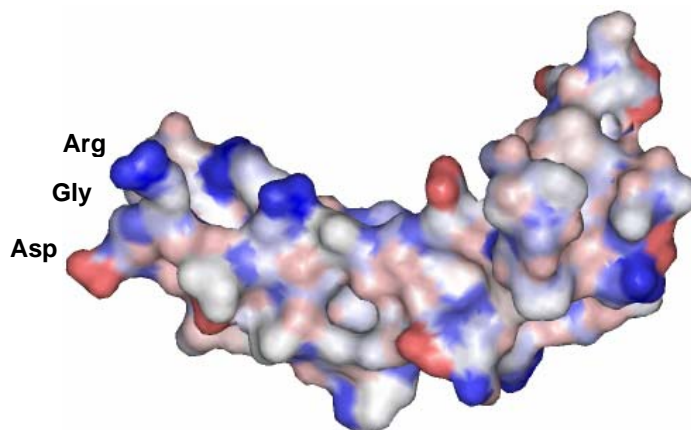


Figura 45: Modelo estrutural da superfície e cargas da DisBa-01. As cargas positivas são representadas em azul e as negativas em vermelho. O pI teórico foi calculado em 4.46 (Expasy – ProtParam: <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>). Imagem gerada com o software WebLab Viewer Pro 3.5.

5.8.2. Modelagem do complexo integrina $\alpha V\beta 3$ -DisBa-01

Utilizando a estrutura sugerida para o complexo echistatina-integrina $\alpha V\beta 3$, baseada em estudos de ligação por fotoafinidade (*Photoaffinity Cross-linking*), foi modelado o complexo entre a toxina DisBa-01 e o mesmo receptor.

O modelo obtido indica a possibilidade da ligação da toxina em estudo com o receptor $\alpha v\beta 3$ quando observadas as compatibilidades estereoquímicas (Figura 46) e as interações atômicas como pontes de hidrogênio (Figura 47) e interações hidrofóbicas.

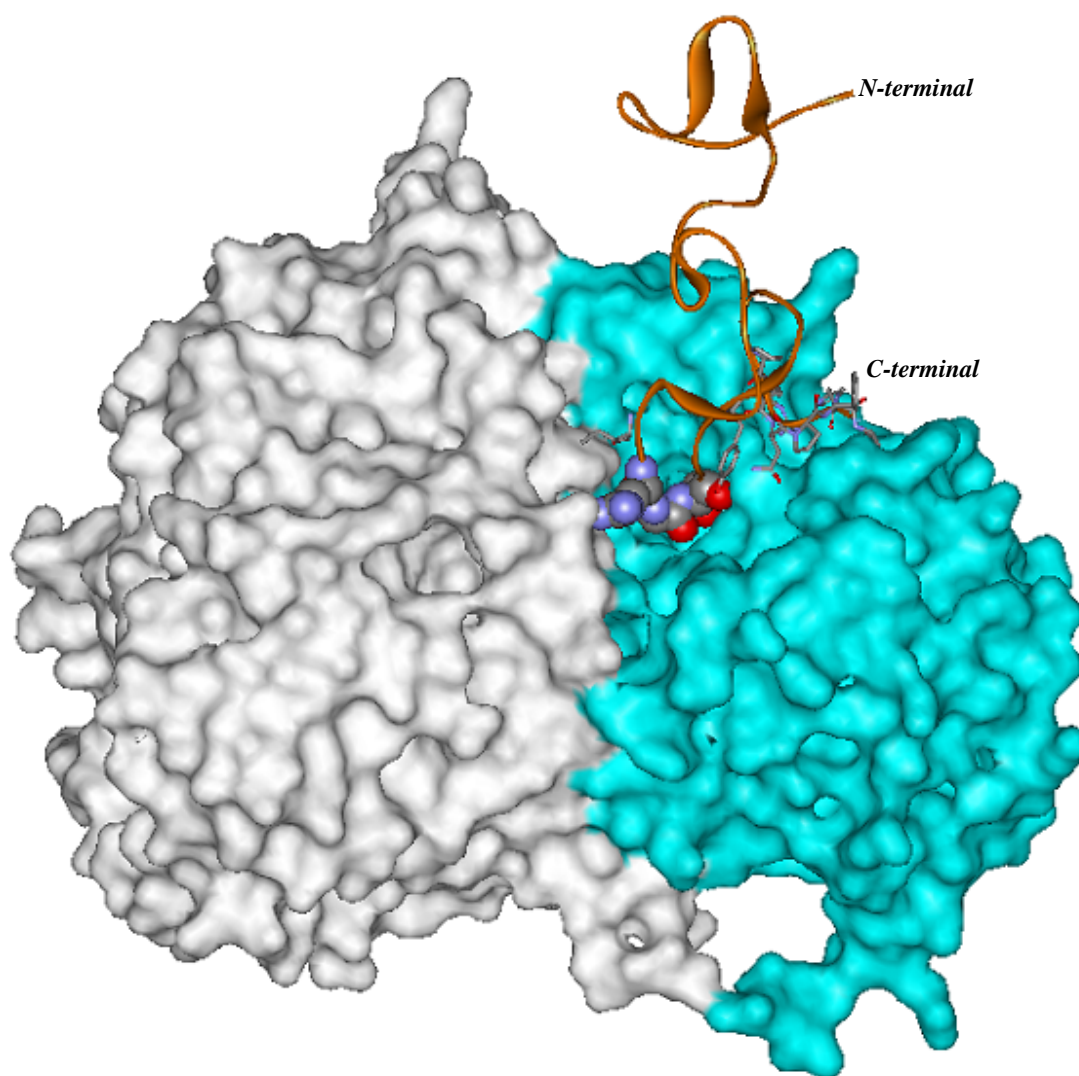


Figura 46: Aspecto da interação geométrica entre a DisBa-01 e a integrina $\alpha V\beta 3$. A toxina é representada pela cor laranja. A subunidade α do receptor é representada em branco e a β em azul.

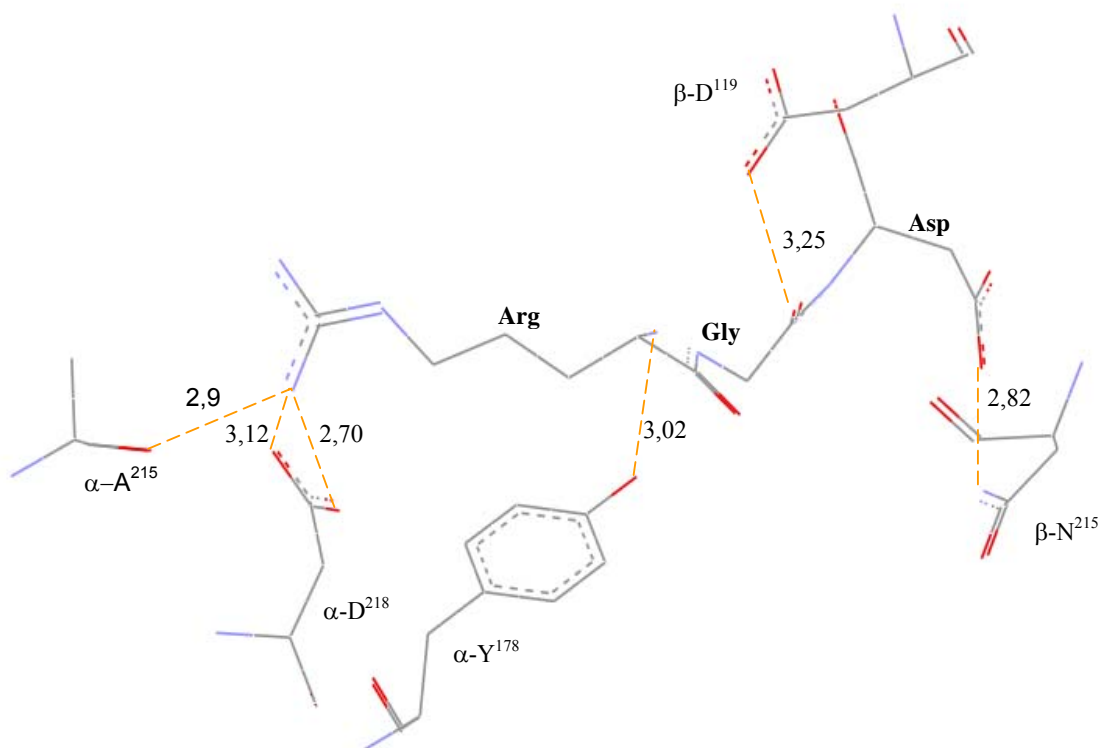


Figura 47: Pontes de hidrogênio entre o motivo RGD da DisBa-01 e a integrina $\alpha V\beta 3$. As pontes de hidrogênio são indicadas pelas linhas pontilhadas. Os números ao lado das linhas indicam as distâncias inter-atômicas. O motivo Arg-Gly-Asp da toxina é indicado pelo código de três letras em negrito. Os resíduos das subunidades alfa e beta da integrina são precedidos respectivamente por α e β e nomeados conforme o código de uma letra. As numerações ao lado dos resíduos do receptor são referentes a aqueles encontrados na estrutura resolvida (XIONG *et al.*, 2002; PDB: [1JV2](#)).

A comparação entre o modelo gerado para a desintegrina livre (descrito no relatório anterior) e a complexada com a integrina $\alpha V\beta 3$ indica grande flexibilidade, principalmente na região da volta mantida por pontes de dissulfeto onde se encontra o motivo RGD e no C-terminal da toxina (Figura 48). Pode-se constatar um aumento de distância entre os átomos terminais das cadeias laterais da Arg e Asp presentes no motivo RGD quando comparando respectivamente, a forma livre e ligada ao receptor.

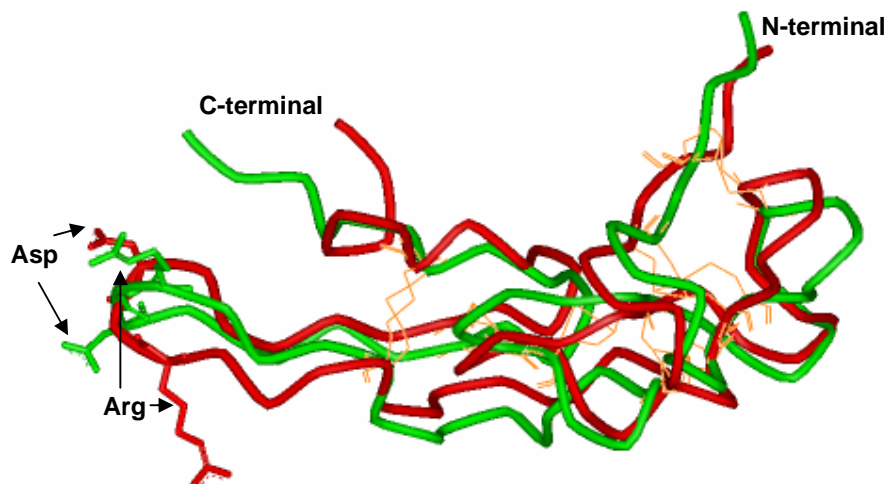


Figura 48: Sobreposição estrutural da DisBa-01 livre e ligada a integrina $\alpha V\beta 3$. A forma livre da desintegrina é representada na cor verde e a ligada em vermelho. Os resíduos de Arg e Asp do motivo RGD são apontados por setas.

Os dados acima sugerem que células que expressem tal integrina podem ser afetadas através da ligação com a toxina em estudo. Entre tais células incluem-se células endoteliais e diversos tipos de células tumorais. A baixa relevância da porção N-terminal da DisBa-01 na ligação com a integrina $\alpha V\beta 3$, possibilita o desenvolvimento de ligantes estruturalmente reduzidos a partir da toxina em estudo. Tal fato provavelmente também ocorra em outros complexos desintegrina-integrina.

5.8.3. Avaliação dos modelos gerados

Os modelos tridimensionais gerados foram verificados quanto a parâmetros frequentemente encontrados em proteínas.

As análises comparativas com os moldes empregados permitem inferir que as estruturas geradas possuem qualidade aceitável para suas utilizações como modelos (resultados disponíveis em CD).

6. DISCUSSÃO

O trabalho realizado inspirou-se na biodiversidade para a busca de soluções aplicadas a problemas de saúde relevantes atualmente. Foram enfocadas toxinas de veneno de serpente conhecidas como desintegrinas, obtidas de um espécime da espécie *Bothrops alternatus*, espécie que habita principalmente no sul e sudeste do Brasil, sul do Paraguai, região central e norte da Argentina, praticamente todo o Uruguai (Figura 49).



Figura 49: Regiões geográficas correspondentes os *habitat* da espécie *Bothrops alternatus* (urutu). Nas escamas da serpente é desenhado um padrão alternado de figuras em forma de ferradura, daí a denominação *alternatus*.

Cerca de 3.200 espécies de serpentes são conhecidas atualmente, mas, apenas a minoria (aproximadamente 200 espécies) pode causar envenenamento em humanos (ROMANO-HOGE, 1990). Na América latina, a maioria das espécies venenosas pertence à família *Crotalidae* e *Viperidae* e seus venenos constituem ricas fontes de compostos ativos na hemostasia. A hemorragia é um dos efeitos mais dramáticos decorrentes do envenenamento (RUCAVADO et al., 1995). Por outro lado, tais compostos podem ser utilizados para a remediação de algumas patologias relevantes atualmente.

A retrospectiva da utilização de toxinas de serpente nos revela vários casos bem sucedidos no desenvolvimento de fármacos, além de servirem muitas vezes como ferramentas na investigação de processos biológicos. Pode-se citar como exemplo, o Captopril (princípio ativo derivado de um Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina, IECA, encontrado no veneno de *Bothrops jararaca*), amplamente utilizado contra a hipertensão (BARREIRO E FRAGA, 2001). Adicionalmente, recentemente foram desenvolvidos novos fármacos contra a trombose e outras patologias cardiovasculares associadas, utilizando desintegrinas. A desintegrina Echistatina (*Echis carinatus*) foi o protótipo do medicamento Aggrastat (Merck) e a desintegrina Kistrina (*Agkistrodon rhodostoma*) foi o protótipo do medicamento Ancrod (Knoll).

Atuando como bloqueadores de integrinas, as desintegrinas podem ser potencialmente utilizadas para o tratamento de patologias como a trombose, o câncer e a osteoporose.

Geralmente, essas toxinas são purificadas diretamente de venenos de serpentes. No entanto, diversos trabalhos que contemplam suas produções recombinantes encontram-se disponíveis na literatura. Esses relatos contemplam

clonagens isoladas ou em projetos de larga escala (ASSAKURA et al., 2003; CHANG et al., 2001; DENNIS, CARTER e LAZARUS, 1993; FAN et al., 1999; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO e HO, 2002; KASHIMA et al., 2004; MOURA-DA-SILVA et al., 1999; PARK et al., 1998; RAHMAN, et al., 1998; WANG et al., 2004; ZHOU et al., 2000b). A maior parte dos trabalhos descreve clonagens de desintegrinas-RGD, cujas atividades foram confirmadas na inibição da agregação plaquetária, na inibição da proliferação de células tumorais e endoteliais, na inibição de metástases tumorais e na inibição da angiogênese.

Os interessantes resultados, previamente obtidos por outros grupos de pesquisa, motivaram a busca por alternativas análogas presentes na biodiversidade brasileira.

Nesse trabalho foram descritos métodos para a obtenção recombinante de desintegrinas, suas caracterizações, ensaios de atividade *in vitro*, ensaios de atividade *in vivo* e estudos estruturais preditivos por biologia computacional. Assim, visando organizar didaticamente a discussão dos resultados obtidos, optou-se por sua subdivisão em quatro frentes: i. Produção da toxina recombinante; ii. Efeitos na hemostasia; iii. Efeitos anti-tumorais e; iv. Estudos preditivos por biologia computacional.

6.1. Produção da toxina recombinante

Utilizando-se as glândulas veneníferas de um espécime de *Bothrops alternatus* foi construída uma biblioteca de cDNAs em bacteriófagos λ recombinantes. Os RNAs obtidos, que serviram de matéria-prima para a construção da biblioteca, representavam fragmentos de até 1.200 pares de bases (dados não exibidos) com bom grau de pureza. O comprimento dos fragmentos

dos RNAs é compatível com o isolamento de pequenas moléculas como, por exemplo, desintegrinas.

Os RNAs totais serviram também para a amplificação de prováveis desintegrinas-RGD médias (Figura 16) e metaloproteases-desintegrinas de *Bothrops alternatus* (Figura 17). Uma desintegrina não RGD, DisBa-02, foi clonada e seqüenciada (Figura 20) porém ensaios de expressão, caracterização bioquímica e de atividade ainda necessitam ser realizados. A DisBa-02, possui um domínio tipo-desintegrina e um domínio rico em cisteínas, ambos com elevada similaridade quando comparados com a ACLD (uma SVMP de classe P-III de *Agkistrodon contortrix laticinctus*). Alinhando-se suas seqüências é possível constatar a mutação de apenas dois resíduos, um em cada domínio. Ambas as mutações são não conservativas.

O rendimento do processo de construção da biblioteca foi considerado bom (7×10^9 pfu/ml) e a partir dela foi possível o isolamento de uma nova desintegrina-RGD, DisBa-01 (Figura 18 e 19), que foi o principal tema desse trabalho. A biblioteca encontra-se armazenada (-80°C) em nosso laboratório e poderá servir de fonte para o estudo de outras toxinas presentes no veneno da serpente. A análise de seqüência da DisBa-01 revelou elevada similaridade com diversas desintegrinas do gênero *Gloydia*, incluindo a ussurina (96% de identidades e 98% de pareamentos positivos, *Gloydia ussuriensis*), halistatina (96% de identidades e 98% de pareamentos positivos, *Gloydia halys*). Elevada similaridade também foi encontrada quando comparada a desintegrinas de outros gêneros como o *Bothrops* (botrostatina, 97% de identidades e 97% de pareamentos positivos, *Bothrops jararaca*), *Trimeresurus* (Trigramina, 87% de identidades e 93% de pareamentos positivos, *Trimeresurus gramineus*) e *Agkistrodon* (Contortrostatina,

83% de identidades e 88% de pareamentos positivos, *Agkistrodon contortrix contortrix*).

Foi intrigante a constatação da presença de uma etiqueta do domínio rico em cisteínas na região 3' não traduzida (3'UTR) do cDNA clonado no vetor pET28a (pDisBa-01, **Figura 19B**). Não foi possível encontrar na literatura a descrição de qualquer desintegrina-RGD com tal domínio. Entre as possíveis causas do resultado obtido incluem-se: i. artefato de PCR induzido pelos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, os quais poderiam forçar a amplificação obtida na disponibilidade de diversas desintegrinas como molde; ii. rearranjo genômico anterior à maturação do transcrito primário e; iii. recombinação durante a maturação de moléculas independentes de mRNAs primários (*trans-splicing*).

Apesar da verdadeira causa da presença da etiqueta do domínio rico em cisteínas ainda requerer investigação, é possível que algum tipo de recombinação genética tenha ocorrido. Alguns estudos descrevem este tipo de fenômeno em serpentes (GONG, ARMUGAM e JEYASEELAN, 2000; COUSIN et al., 1998; KORDIS e GUBENSEK, 1996). Siigur, Aaspollu e Siigur (2001) sugeriram a possibilidade da ocorrência de *trans-splicing* em alguns mRNAs de serinoproteases.

De qualquer maneira, segundo resultados obtidos incluindo análises de mobilidade eletroforética e espectrometria de massa, para efeito prático, apenas o primeiro domínio deve ser expresso em decorrência da presença de um códon de parada entre o domínio desintegrina e a etiqueta C-terminal do domínio rico em cisteínas.

Os ensaios de expressão e solubilidade da toxina recombinante, DisBa-01, confirmam a produção em bactéria de uma proteína com cerca de 12kDa

encontrada principalmente em corpos de inclusão, mas, que pode ser recuperada através da desagregação por agentes caotrópicos (**Figura 22**).

Em sistemas bacterianos é freqüente a deposição de proteínas recombinantes na forma de agregados que podem se formar tanto no citoplasma quanto no espaço periplásmico (BANEYX, 1999; GEORGIU et al.1986; GEORGIU E VALAX, 1996; GEORGIU E VALAX, 1999; MARSTON, 1986).

Esses agregados que possuem tamanho e volume máximo de $1\mu\text{m}$ e $0,6\mu\text{m}^3$, respectivamente, são conhecidos como corpos de inclusão (IBs). Tais formações são associadas a um aumento de estruturas β em relação à estrutura nativa (AMI et al., 2003; AMI et al., 2005; CARRIÓ et al. 2005). Geralmente a proteína recombinante corresponde entre 80-95% dos IBs (VALAX e GEORGIU, 1993). O fato da proteína-alvo apresentar-se parcialmente purificada em IBs é explorado para a produção de proteínas tóxicas, instáveis ou de fácil reenovelamento. Contudo, o fato de estarem insolúveis impede o emprego direto da proteína obtida nos processos usualmente empregados de purificação, experimentação e aplicação usualmente empregados.

Uma série de métodos foi proposta para a mobilização de proteínas seqüestradas em agregados protéicos (SORENSEN e MORTENSEN, 2005) para proteínas solúveis, incluindo abordagens *in vivo* (testar a expressão em: diferentes temperaturas, linhagens, meios e taxas de transcrição, presença de chaperonas, presença de tRNAs complementares) e *in vitro* (realização de uma triagem com diversos tampões e a utilização de técnicas de reenovelamento).

No presente trabalho a toxina em estudo pode ser solubilizada por agente caotrópico (Uréia 6M), permitindo sua submissão a sucessivas etapas cromatográficas para a purificação, incluindo cromatografia por quelação de

metal, cromatografia de exclusão molecular (Figura 23) e cromatografia por interações hidrofóbicas em HPLC (Figura 25).

A proteína obtida foi submetida a sequenciamento automático de proteínas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM-DCF-UFSCar) e a espectrometria de massa no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos (Hemocentro-USP-Ribeirão Preto) sob a supervisão do Prof. Dr. José César Rosa. Os resultados sugerem que a seqüência primária da desintegrina foi preservada, excetuando-se pela remoção da metionina inicial.

Uma vez confirmada a seqüência primária, restava saber se o enovelamento protéico obtido era adequado. Assim, atividade da proteína foi sondada por ensaios de atividade *in vitro* e *in vivo* (Subseções: 4.5 e 4.6).

6.2. Efeitos na hemostasia

No veneno de serpentes pelo menos três tipos de proteínas possuem atividade inibitória da agregação plaquetária (ADPases, α -fibrinogenases e desintegrinas). As desintegrinas têm recebido atenção especial devido a seu antagonismo seletivo da última fase da agregação plaquetária (ligação entre a integrina α IIb β 3 e fibrina para a formação de agregados). Essa propriedade é aplicada ao bloqueio da agregação induzida por uma variedade de agentes, interessante do ponto de vista terapêutico, uma vez que diversas patologias do sistema cardiovascular possuem origens também diversas.

Visando constatar a atividade da proteína expressa no sistema bacteriano, *Escherichia coli* BL21(DE3) pDisBa-01, as amostras purificadas foram submetidas a alguns ensaios relativos a processos hemostáticos, incluindo: i. o efeito na agregação plaquetária; ii. a competição pela ligação com a integrina α IIb β 3 de

plaquetas ativadas; iii. o efeito na trombose induzida *in vivo* e; iv. o efeito no tempo de sangramento.

Os IC₅₀s obtidos para a inibição da agregação plaquetária induzida por ADP sugerem que a desintegrina possui maior afinidade pela integrina α IIb β 3, respectivamente, de camundongos, de coelhos e humanas (figuras 30, 28 e 29, respectivamente). Esses resultados parecem traduzir um caráter evolutivo da toxina, com maior seletividade para presas naturais.

Também foi observada forte inibição da agregação induzida por colágeno. A proximidade entre os IC₅₀s estimados para ambos os indutores sugere que o bloqueio ocorra na etapa final do fenômeno.

A alta afinidade pela integrina α IIb β 3 foi confirmada pelo deslocamento de seu ligante endógeno (fibrinogênio, IC₅₀=25nM, Figura 31A) e do anticorpo específico contra a forma ativada dessa integrina (PAC-1, IC₅₀=70nM, Figura 31B).

No modelo de trombose *in vivo* induzida por FeCl₃, a toxina mostrou-se eficaz na inibição da formação de trombos. Os resultados obtidos revelam um efeito mais evidente na inibição da formação de trombos em arteríolas que aquele observado em vênulas (Figura 36 e 37). Em ambos os sistemas, a maioria dos animais que recebeu a toxina não apresentou oclusão trombótica até sessenta minutos a contar do momento da aplicação do indutor. Comparando-se trombos arteriais e venosos, observa-se uma maior quantidade de fibrina e hemácias no segundo caso. A maior densidade verificada em trombos venosos pode ser um fator que dificulta o acesso de moléculas, o que por sua vez, pode explicar uma eficácia inferior da toxina na formação desse tipo de distúrbio hemostático.

Durante a realização dos experimentos de inibição da trombose *in vivo*, foi observada uma maior predisposição de animais tratados a ocorrência espontânea

de hemorragias (Alexandre Kauskot e Dr. Arnaud Bonnefoy, comunicação pessoal). Tal efeito colateral pode ser confirmado pelo aumento significativo no tempo de sangramento verificado em animais que receberam a toxina (2mg/ml, **Figura 38**). O mesmo efeito colateral também foi descrito para outras desintegrinas (COOK et al., 1989; BEVIGLIA et al., 1993, SHEU et al., 1995), assim como para fármacos de uso clínico rotineiro contra a trombose (CAHILL et al., 2005; MATSUNO et al., 1999). Assim, na possibilidade da utilização clínica da DisBa-01, deve ser pesquisada uma dose otimizada através da análise de curvas dose/tempo de sangramento e dose/inibição da trombose.

6.3. Efeitos anti-tumorais

A ocorrência de metástases durante estados cancerígenos é um complicador relevante nessa patologia. Os fatores celulares e moleculares presentes no momento da adesão de células tumorais ao endotélio vascular de órgãos-alvo são fundamentais para o processo. Incluem-se entre esses fatores células (principalmente leucócitos e plaquetas) e proteínas plasmáticas ou da ECM (**Figura 9**). Uma vez ligadas às células endoteliais, uma retração é induzida nas últimas, expondo a membrana basal adjacente e propiciando a ligação das células tumorais à ECM.

As plaquetas podem facilitar o extravasamento de células tumorais, potencializando as interações adesivas com as proteínas da membrana basal endotelial (DARDIK et al., 1997; FELDING-HABERMANN et al., 1996; HONN, TANG e CRISSMAN, 1992) e ECM (MENTER et al., 1987). Adicionalmente foi constatado que certas células tumorais não se aderem diretamente à ECM, mas sim, a plaquetas que, por sua vez, aderem-se a ECM (FELDING-HABERMANN et al., 1996; KARPATKIN et

al., 1988). Também se constatou que a inibição da atividade de integrinas $\alpha\text{IIb}\beta_3$ plaquetárias, inibe a adesão de células tumorais (FELDING-HABERMANN et al., 1996) e impede a ocorrência de metástases.

As plaquetas podem interagir com certas células tumorais de melanoma, de câncer de mama e do colo do útero através da integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ plaquetária (DARDIK et al., 1997; HONN et al., 1994; NIERODZIK et al., 1991). As interações entre as células tumorais e as plaquetas são eventos ativos e envolvendo especificamente a integrina $\alpha\text{V}\beta_3$ tumoral e a integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (FELDING-HABERMANN et al., 2001) de plaquetas por intermédio de proteínas plasmática (Fg, vWF, TSP, Fn ou Vn; FELDING-HABERMANN et al., 1996). A trombina, capaz de ativar a integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ plaquetária, pode estimular a ligação entre plaquetas e células tumorais pelo aumento da expressão de integrina $\alpha\text{v}\beta_3$ nas últimas (TSOPANOGLOU e MARAGOUDAKIS, 2004).

Por outro lado, sabe-se hoje que várias células tumorais expressam a integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, possibilitando uma agregação entre células neoplásicas e plaquetas por mecanismo similar a agregação plaquetária homotípica (KONSTANTOPOULOS, KUKRETI e MCINTIRE, 1998). O lipídeo bioativo, 12(S)-HETE, liberado por plaquetas ativadas, pode ativar a integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ tumoral (GROSSI et al., 1989), permitindo a adesão dessas à ECM e a plaquetas.

Certas células tumorais são igualmente capazes de expressar o complexo GPIb-IX-V e de disparar a agregação plaquetária (OLEKSOWICZ et al., 1995), favorecendo a formação de metástases.

O conhecimento dos mecanismos moleculares relacionados às inter-relações entre células tumorais, plaquetas e ECM, são de interesse para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando bloquear metástases. A

ligação de desintegrinas à integrinas dos diversos tipos celulares envolvidos, parece uma estratégia promissora para dificultar a ocorrência de metástases.

Neste trabalho foram descritas abordagens iniciais da verificação dos efeitos anti-tumorais da DisBa-01. A toxina demonstrou atividade inibitória da proliferação de células portadoras de integrina $\alpha V\beta 3$ (Figuras 26, 33 e 34), mas não de linhagens celulares com reduzida expressão dessa integrina (Figura 32). Esses resultados sugerem uma dependência, ao menos parcial, dessa integrina para a proliferação em linhagens que a expressam de maneira representativa. Nas linhagens afetadas (HMEC-1 e B16F10-2B8), o efeito observado é dose/tempo dependente. Observam-se efeitos mais evidentes em maiores doses e menores tempos. Tais resultados levam a pensar em uma inativação da desintegrina, seja por clivagem proteolítica, seja por internalização.

Uma evidência suplementar da interação entre a DisBa-01 e a integrina $\alpha V\beta 3$ foi obtida através de ensaios de inibição da adesão de células B16F10-2B8 à vitronectina (Figura 35). Entretanto, não é possível negligenciar o fato que outras integrinas, presentes nessa linhagem de melanoma, possivelmente liguem-se a essa proteína da ECM (Tabela 1). É possível que os efeitos observados sejam decorrentes não somente de bloqueio simples de integrinas, mas, também de suas internalizações por endocitose como já demonstrado para outros ligantes desses receptores (CASTEL et al., 2001).

A salmosina (uma desintegrina RGD) recombinante também inibiu de maneira similar a proliferação de células B16F10 aderidas ao colágeno imobilizado e a adesão dessas células à vitronectina (KANG et al., 2000). Os autores sugerem que os efeitos observados sejam decorrentes do bloqueio de integrinas associadas à sobrevivência dessa linhagem celular. Paralelamente, ficou

demonstrado que peptídeos RGD são capazes de induzir a apoptose mediada pela ativação de caspase-3 (BUCKLEY et al., 1999). Esse conjunto de resultados indica a possibilidade de que a diminuição na proliferação observadas sejam oriundas do disparo de mecanismos apoptóticos. Contudo, seria interessante verificar se essa apoptose relaciona-se, ou não, com eventos de desadesão celular.

Ensaio *in vivo*, após a administração de DisBa-01 em dose única, demonstram que a toxina foi capaz de inibir a formação de focos metastáticos de células B16F10-2B8 em camundongos C57Bl6/j (Figuras 39 a 41). Apesar do mecanismo exato da inibição das metástases ainda requerer estudos mais aprofundados, é provável que o antagonismo de integrinas leve a inibição da formação de agregados envolvendo células tumorais e outras células do sangue. Tendo em vista o papel relevante de plaquetas na formação de metástases (Subseção: 1.2.1) e comprovada a atividade inibitória na formação de trombos *in vivo* pela DisBa-01 (Subseção: 5.6.1), é possível que a atividade anti-metastática observada seja, ao menos em parte, devido à inibição da formação de agregados celulares entre células tumorais e plaquetas.

Adicionalmente, o bloqueio de integrinas relevantes durante os processos de ancoragem e invasão deve ser considerado como mecanismo suplementar para a inibição de metástases. Danen et al. (1998) demonstraram que o bloqueio da integrina $\alpha 4\beta 1$ em células tumorais por uma desintegrina-RGD (eristostatina) leva a inibição da ligação dessa integrina com a VCAM-1 (molécula de adesão de células vasculares 1) de células endoteliais. Essa interação inibida entre células tumorais e endoteliais, provavelmente, correlaciona-se com a inibição das metástases observadas.

Utilizando um sistema experimental bastante similar ao apresentado neste trabalho, Beviglia Stewart e Niewiarowski (1995) demonstraram a inibição de metástases de células B16F10 em camundongos C57BL/6 por quatro desintegrinas. A desintegrina mais eficaz nesse modelo, eristostatina, apresentou uma inibição de 50% das metástases em uma dose de 50nmoles/camundongo. Kang et al. (2000), utilizando a mesma linhagem celular, também demonstraram uma forte atividade anti-metastática da salmosina. No presente estudo, a administração de DisBa-01 na dose de 2,5 nmoles (30µg)/camundongo foi responsável por uma inibição média de aproximadamente 92% das metástases pulmonares observadas no décimo segundo dia após a injeção das células tumorais B16F10-2B8.

Assim como demonstram os resultados obtidos para a salmosina (KANG et al., 2000), a atividade da DisBa-01 provavelmente não está relacionada com citotoxicidade. Nas mesmas condições utilizadas para os experimentos *in vivo*, não foi constatada atividade citotóxica em células B16F10-2B8 (Figura 42), assim como, nenhuma alteração comportamental ou fatalidade foi observada nos animais utilizados.

Diversos relatos sugerem que desintegrinas são rapidamente metabolizadas *in vivo* (Cook et al., 1989; Shebuski et al., 1989; Sheu et al., 1995; Swenson et al., 2004). Neste trabalho os resultados obtidos *in vitro* sugerem uma inativação gradativa da DisBa-01. Assim, é possível que as atividades anti-trombóticas e anti-metastáticas observadas *in vivo* sejam decorrentes de um efeito agudo e rapidamente reversível.

6.4. Estudos preditivos por biologia computacional

Através de modelagem molecular baseada em homologia foi possível chegar a um modelo estrutural confiável para a toxina em estudo. A análise do modelo sugere que a desintegrina ácida (pI teórico= 4.46, **Figura 45**) é mantida por seis pontes de dissulfeto e possui três pequenas folhas β compostas de duas fitas cada. As cadeias laterais dos resíduos de Arg e de Asp que compõem o motivo RGD apontam em direções opostas (**Figura 44**). As raízes médias quadradas (RMS) calculadas ao se comparar os carbonos α (C- α) entre o modelo e os moldes (Trimestatina, PDB: [1J2L](#); Flavoridina, PDB: [1FVL](#)) foram de respectivamente de 0,40 e 2,41Å.

Também foi construído um modelo do complexo integrina $\alpha V\beta 3$ -DisBa-01, utilizando-se o complexo obtido para a echistatina com a mesma integrina baseando-se em resultados experimentais de ligação por fotoafinidade. O complexo obtido demonstra uma ligação majoritária à subunidade $\beta 3$ da integrina.

O resíduo de Arg do motivo RGD, interage com resíduos da subunidade αV (A²¹⁵, D²¹⁸, Y¹⁷⁸). Outros resíduos N-terminais em relação a essa Arg também realizam contatos com essa subunidade. Já o resíduo de Asp encontra-se enterrado em uma bolsa da subunidade $\beta 3$ próxima, ao sítio de ligação a metais (MIDAS), estabelecendo uma ponte de hidrogênio com um resíduo de Asn (Asn²¹⁵). Observa-se ainda que boa parte dos contatos entre a toxina e o receptor são mediados pela cauda C-terminal da primeira (**Figura 46**). Foi verificada uma extensa rede de pontes de hidrogênio (14) e contatos hidrofóbicos (> 50), a figura 45 exibe algumas pontes formadas com o motivo RGD.

A comparação das formas livre e complexada da DisBa-01 revela que apesar da elevada concentração de pontes de dissulfeto, sua estrutura exibe uma

flexibilidade considerável. Tal flexibilidade é evidente nas regiões que correspondem à volta RGD e ao C-terminal da molécula, regiões que interagem com a integrina, enquanto que uma flexibilidade reduzida é observada nas pequenas folhas β . A RMS de distâncias de carbonos α para o motivo RGD e dois resíduos adicionais em cada lado do motivo (7 resíduos no total) é de 6.03Å para todos os átomos e de 3.4Å comparando apenas os $C\alpha$. Para a seqüência C-terminal NPFH, uma RMS de 8,25Å é observada para todos os átomos e de 6,56Å incluindo-se apenas os $C\alpha$.

Contudo, é necessário dizer que a presença de metal no MIDAS não é contemplada no modelo ECH-integrina $\alpha V\beta 3$, usado aqui como molde. Assim, algumas modificações nos contatos estabelecidos entre receptor e a desintegrina na presença do metal (Ca^{++}) são esperadas.

As avaliações dos modelos gerados indicam que as estruturas obtidas são aceitáveis de acordo com os critérios adotados pelos programas de avaliação utilizados (disponível em CD).

6.5. *Discussões finais e perspectivas futuras*

Os resultados apresentados demonstram de maneira clara alguns dos efeitos da DisBa-01 na hemostasia e tumorigênese, incluindo efeitos antitrombóticos e anti-metastáticos. Tais resultados sugerem a continuação da prospecção dessa toxina no desenvolvimento de um agente aplicado a patologias relevantes atualmente como a trombose e o câncer. Diversos estudos podem vir a complementar e gerar avanços no trabalho desenvolvido. Alguns desses estudos serão sucessivamente listados a seguir.

A inibição da agregação plaquetária em PRP de camundongos seria desejável para uma análise comparativa de IC_{50} s, incluindo os obtidos para PRP de coelho e humano. Caso venha a ser comprovada uma potência decrescente nas espécies empregadas (camundongo >> coelho >> humanos), interessantes conclusões podem ser formuladas do ponto de vista evolutivo da toxina.

Os resultados dos efeitos da toxina na ligação de células HMEC-1 à vitronectina, forneceria maior respaldo a hipótese de uma interação entre a DisBa-01 e a integrina $\alpha V\beta 3$. Ainda mais convenientes seriam os estudos dos efeitos sobre a adesão de células portadoras de integrinas $\alpha V\beta 3$ a um ligante mais específico como o fator de von Willebrand (vWF) ou anticorpos específicos. Alternativamente, estudos de competição pela integrina seguidos de análises por citometria de fluxo poderiam ser empregados. Adicionalmente, seria interessante a realização de estudos similares envolvendo outras integrinas, como a $\alpha 4\beta 1$, a $\alpha 5\beta 1$ e integrinas possuidoras de subunidade $\beta 2$.

As dúvidas a respeito das verdadeiras causas da inibição da proliferação de células HMEC-1 e B16F10 na presença da toxina pedem a realização de ensaios para a verificação de desadesão e de indução de apoptose. Tendo-se em mente que processos de desadesão de células que crescem aderidas geralmente relacionam-se com apoptose, espera-se que ensaios de desadesão venham auxiliar o esclarecimento desse tema. Um bom complemento para tais estudos seriam as investigações de potenciais cascatas de sinalização disparadas pela ligação da toxina à integrinas presentes na superfície celular.

Em relação aos efeitos *in vivo*, testes adicionais permitiriam a verificação dos efeitos durante a administração de múltiplas doses da toxina ou de infusões contínuas. Ainda nessa linha de raciocínio seria interessante a verificação da

eficácia deste esquema de administração no desenvolvimento de metástases, crescimento tumoral e regressão tumoral. Estudos para a verificação dos efeitos na angiogênese *in vivo* utilizando injeção de matrigel (BAGHERI-YARMAND et al., 1999) já foram realizados na presença e ausência de DisBa-01 (20, 100 e 1000ng) e aguardam análise. Também contribuiria para a compreensão do mecanismo de ação anti-tumoral à realização de ensaios visando verificar os efeitos da desintegrina recombinante na angiogênese intratumoral em diferentes esquemas posológicos.

Pesquisas a respeito da biodisponibilidade da toxina, incluindo a estimativa de sua meia-vida ($t_{1/2}$), viriam auxiliar a compreensão tempo-dependente das características de seus efeitos. Estudos de outras formas de entrega da toxina como, por exemplo, o emprego de lipossomas, seriam bem vindos para a obtenção de formulações mais estáveis. Somando-se a proteção da toxina por tecnologias de entrega e a maior tendência da ocorrência de extravasamentos em endotélios neoformados, espera-se uma maior concentração da desintegrina em focos tumorais, aumentando-se assim sua eficácia e reduzindo os possíveis efeitos colaterais.

Devido a potente inibição da agregação plaquetária pela DisBa-01 espera-se que toxina seja útil em processos de circulação extracorpórea (como hemodiálises) evitando problemas relacionados a esse processo, conforme previamente descrito para outras desintegrinas (MUSIAL et al., 1990).

Uma possível aplicação bioquímica seria o seu emprego na purificação de integrinas através de sua imobilização em resinas cromatográficas. Um método com tal finalidade foi sugerido por (MARCINKIEWICZ et al., 1996).

O estudo de variantes estruturais da toxina estudada poderia contribuir para o melhor entendimento das porções moleculares responsáveis por sua interação com integrinas e por seus efeitos. A obtenção recombinante de versões estruturalmente reduzidas da DisBa-01 tem sido o objetivo do projeto de mestrado de uma integrante de nosso grupo de pesquisa, Carmen Lúcia Salla Pontes.

Por fim, métodos experimentais, como NMR e cristalografia associada à difração de raios X, seriam uma ótima opção para a determinação da estrutura da DisBa-01 livre e complexada a integrinas. Tais estudos forneceriam valiosas informações sobre as características de interações de desintegrinas a esses receptores, favorecendo o desenho de peptídeos ou fármacos agonistas/antagonistas.

7. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- ✓ Uma biblioteca de cDNAs em fagos λ foi construída com sucesso a partir de transcritos da glândula venenífera de um espécime de *Bothrops alternatus* (urutu). Na biblioteca estão representados fragmentos de até 1200 pares de base.
- ✓ A biblioteca de cDNAs obtida poderá servir para a clonagem de novas toxinas.
- ✓ Duas novas desintegrinas de *Bothrops alternatus* foram clonadas e seqüenciadas. Também foi possível a amplificação de outras moléculas como desintegrinas médias e metaloproteinases-desintegrinas.
- ✓ A nova desintegrina-RGD, DisBa-01 pode ser expressa em bactérias e purificada com sucesso.
- ✓ A DisBa-01 mostrou-se um potente inibidor da agregação plaquetária, *in vitro* e *in vivo*, através do bloqueio da integrina α IIb β 3 plaquetária.
- ✓ A toxina exibiu efeitos inibitórios significativos na proliferação de células de melanoma (B16F10-2B8) e de células endoteliais (HMEC-1). Esse efeito parece ser limitado a células que expressam níveis mais elevados da integrina α V β 3.
- ✓ A toxina inibiu a adesão de células B16F10-2B8 à vitronectina, provavelmente através do bloqueio da integrina α V β 3.
- ✓ A toxina mostrou-se efetiva na inibição da trombose e metástase *in vivo*.
- ✓ Para a utilização da toxina *in vivo* são necessários estudos suplementares visando o ajuste de dose da toxina, onde ocorra à maximização do efeito terapêutico e a minimização do efeito tóxico (aumento do tempo de sangramento).
- ✓ Diversos estudos ainda necessitam ser realizados rumo ao desenho de um fármaco aplicado a doenças atuais como a trombose, câncer e osteoporose. Tais estudos são sugeridos na subseção 6.5.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABECASSIS, J.; MILLON-COLLARD, R.; KLEIN-SOYER, C.; NICORA, F.; FRICKER, J. P.; BERETZ, A. et al. Adhesion of human breast cancer cell line MCF-7 to human vascular endothelial cells in culture. Enhancement by activated platelets. **Int.J.Cancer**, v. 40, n. 4, p. 525-531, 1987.
2. ADLER, M.; LAZARUS, R. A.; DENNIS, M. S.; WAGNER, G. Solution structure of kistrin, a potent platelet aggregation inhibitor and GP IIb-IIIa antagonist. **Science**, v. 253, n. 5018, p. 445-448, 1991.
3. ALIMENTI, E.; TAFURI, S.; SCIBELLI, A.; D'ANGELO, D.; MANNA, L.; PAVONE, L. M. et al. Pro-apoptotic signaling pathway activated by echistatin in GD25 cells. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1693, n. 1, p. 73-80, 2004.
4. ALPERT, J. S.; DALEN, J. E. Epidemiology and natural history of venous thromboembolism. **Prog.Cardiovasc.Dis.**, v. 36, n. 6, p. 417-422, 1994.
5. AMI, D.; BONECCHI, L.; CALI, S.; ORSINI, G.; TONON, G.; DOGLIA, S. M. FT-IR study of heterologous protein expression in recombinant Escherichia coli strains. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1624, n. 1-3, p. 6-10, 2003.
6. AMI, D.; NATALELLO, A.; GATTI-LAFRANCONI, P.; LOTTI, M.; DOGLIA, S. M. Kinetics of inclusion body formation studied in intact cells by FT-IR spectroscopy. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 16, p. 3433-3436, 2005.
7. ANDOH, K.; KUBOTA, T.; TAKADA, M.; TANAKA, H.; KOBAYASHI, N.; MAEKAWA, T. Tissue factor activity in leukemia cells. Special reference to disseminated intravascular coagulation. **Cancer**, v. 59, n. 4, p. 748-754, 1987.
8. ARNAOUT, M. A. Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. **Immunol.Rev.**, v. 114, p. 145-180, 1990.
9. ASSAKURA, M. T.; SILVA, C. A.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of Bothrops jararaca. **Toxicon**, v. 41, n. 2, p. 217-227, 2003.
10. AU, L. C.; HUANG, Y. B.; HUANG, T. F.; TEH, G. W.; LIN, H. H.; CHOO, K. B. A. common precursor for a putative hemorrhagic protein and rhodostomin, a platelet aggregation inhibitor of the venom of Calloselasma rhodostoma: molecular cloning and sequence analysis. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, v. 181, n. 2, p. 585-593, 1991.

11. BABU, Y. S.; EALICK, S. E.; BUGG, C. E.; ERION, M. D.; GUIDA, W. C.; MONTGOMERY, J. A. et al. Structure-based design of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. **Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.**, v. 51, n. Pt 4, p. 529-535, 1995.
12. BAGHERI-YARMAND, R.; KOURBALI, Y.; RATH, A. M.; VASSY, R.; MARTIN, A.; JOZEFONVICZ, J. et al. Carboxymethyl benzylamide dextran blocks angiogenesis of MDA-MB435 breast carcinoma xenografted in fat pad and its lung metastases in nude mice. **Cancer Res.**, v. 59, n. 3, p. 507-510, 1999.
13. BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Curr.Opin.Biotechnol.**, v. 10, n. 5, p. 411-421, 1999.
14. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Planejamento racional baseado no mecanismo de ação: fármacos inteligentes. In: **Química Medicinal: As bases moleculares da ação de fármacos**. Porto Alegre - RS: ARTMED Editora S.A., 2001. Cap. 3 , p. 83-124.
15. Bayer. **INTERFARMA**. Seção: Associadas. Disponível em: <<http://www.interfarma.org.br/>>. Acesso em: 17 de Maio de 2005.
16. BEAUVAIS, D. M.; RAPRAEGER, A. C. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. **Reprod.Biol.Endocrinol.**, v. 2, p. 32004.
17. BEAUVAIS, D. M.; BURBACH, B. J.; RAPRAEGER, A. C. The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. **J.Cell Biol.**, v. 167, n. 1, p. 171-181, 2004.
18. BEVIGLIA, L.; POGGI, A.; ROSSI, C.; MCLANE, M. A.; CALABRESE, R.; SCANZIANI, E. et al. Mouse antithrombotic assay. Inhibition of platelet thromboembolism by disintegrins. **Thromb.Res.**, v. 71, n. 4, p. 301-315, 1993.
19. BEVIGLIA, L.; STEWART, G. J.; NIEWIAROWSKI, S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. **Oncol.Res.**, v. 7, n. 1, p. 7-20, 1995.
20. BILATO, C.; CURTO, K. A.; MONTICONE, R. E.; PAULY, R. R.; WHITE, A. J.; CROW, M. T. The inhibition of vascular smooth muscle cell migration by peptide and antibody antagonists of the alphavbeta3 integrin complex is reversed by activated calcium/calmodulin- dependent protein kinase II. **J.Clin.Invest**, v. 100, n. 3, p. 693-704, 1997.
21. BILGRAMI, S.; TOMAR, S.; YADAV, S.; KAUR, P.; KUMAR, J.; JABEEN, T. et al. Crystal structure of schistatin, a disintegrin homodimer from saw-scaled viper (Echis carinatus) at 2.5 Å resolution. **J.Mol.Biol.**, v. 341, n. 3, p. 829-837, 2004.

22. BILGRAMI, S.; YADAV, S.; KAUR, P.; SHARMA, S.; PERBANDT, M.; BETZEL, C. et al. Crystal Structure of the Disintegrin Heterodimer from Saw-Scaled Viper (*Echis carinatus*) at 1.9 Å Resolution. **Biochemistry**, v. 44, n. 33, p. 11058-11066, 2005.
23. BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol.Ther.**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.
24. BLOBEL, C. P.; WOLFSBERG, T. G.; TURCK, C. W.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J. M. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature**, v. 356, n. 6366, p. 248-252, 1992.
25. BLUNDELL, T. L.; LAPATTO, R.; WILDERSPIN, A. F.; HEMMINGS, A. M.; HOBART, P. M.; DANLEY, D. E. et al. The 3-D structure of HIV-1 proteinase and the design of antiviral agents for the treatment of AIDS. **Trends Biochem.Sci.**, v. 15, n. 11, p. 425-430, 1990.
26. BLYSTONE, S. D.; GRAHAM, I. L.; LINDBERG, F. P.; BROWN, E. J. Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1. **J.Cell Biol.**, v. 127, n. 4, p. 1129-1137, 1994.
27. BLYSTONE, S. D.; LINDBERG, F. P.; LAFLAMME, S. E.; BROWN, E. J. Integrin beta 3 cytoplasmic tail is necessary and sufficient for regulation of alpha 5 beta 1 phagocytosis by alpha v beta 3 and integrin-associated protein. **J.Cell Biol.**, v. 130, n. 3, p. 745-754, 1995.
28. BLYSTONE, S. D.; SLATER, S. E.; WILLIAMS, M. P.; CROW, M. T.; BROWN, E. J. A molecular mechanism of integrin crosstalk: alphavbeta3 suppression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates alpha5beta1 function. **J.Cell Biol.**, v. 145, n. 4, p. 889-897, 1999.
29. BODE, W.; KRESS, L. F.; MEYER, E. F.; GOMIS-RUTH, F. X. The crystal structure of adamalysin II, a zinc-endopeptidase from the snake venom of the eastern diamondback rattlesnake *Crotalus adamanteus*. **Braz.J.Med Biol.Res.**, v. 27, n. 8, p. 2049-2068, 1994.
30. BONNEFOY, A.; HANTGAN, R.; LEGRAND, C.; FROJMOVIC, M. M. A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor. **J.Biol.Chem.**, v. 276, n. 8, p. 5605-5612, 2001.
31. BOSETTI, C.; MALVEZZI, M.; CHATENOU, L.; NEGRI, E.; LEVI, F.; LA VECCHIA, C. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. **Ann.Oncol.**, v. 16, n. 3, p. 489-511, 2005.
32. BROOKS, P. C.; MONTGOMERY, A. M.; ROSENFELD, M.; REISFELD, R. A.; HU, T.; KLIER, G. et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1157-1164, 1994.

33. BUCKLEY, C. D.; PILLING, D.; HENRIQUEZ, N. V.; PARSONAGE, G.; THRELFALL, K.; SCHEEL-TOELLNER, D. et al. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. **Nature**, v. 397, n. 6719, p. 534-539, 1999.
34. CAHILL, R. A.; MCGREAL, G. T.; CROWE, B. H.; RYAN, D. A.; MANNING, B. J.; CAHILL, M. R. et al. Duration of increased bleeding tendency after cessation of aspirin therapy. **J.Am.Coll.Surg.**, v. 200, n. 4, p. 564-573, 2005.
35. CAINE, G. J.; STONELAKE, P. S.; REA, D.; LIP, G. Y. Coagulopathic complications in breast cancer. **Cancer**, v. 98, n. 8, p. 1578-1586, 2003.
36. CAIRNS, R. A.; KHOKHA, R.; HILL, R. P. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. **Curr.Mol.Med.**, v. 3, n. 7, p. 659-671, 2003.
37. CALVETE, J. J.; MORENO-MURCIANO, M. P.; THEAKSTON, R. D.; KISIEL, D. G.; MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem.J.**, v. 372, n. Pt 3, p. 725-734, 2003.
38. CARRIO, M.; GONZALEZ-MONTALBAN, N.; VERA, A.; VILLAVERDE, A.; VENTURA, S. Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. **J.Mol.Biol.**, v. 347, n. 5, p. 1025-1037, 2005.
39. CASTEL, S.; PAGAN, R.; MITJANS, F.; PIULATS, J.; GOODMAN, S.; JONCZYK, A. et al. RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of alpha(v)-integrin, enter the cells by independent endocytic pathways. **Lab Invest**, v. 81, n. 12, p. 1615-1626, 2001.
40. CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat.Rev.Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563-572, 2002.
41. CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol.**, v. 11, n. 11, p. S37-S43, 2001.
42. CHANG, C. P.; CHANG, J. C.; CHANG, H. H.; TSAI, W. J.; LO, S. J. Positional importance of Pro53 adjacent to the Arg49-Gly50-Asp51 sequence of rhodostomin in binding to integrin alpha11beta3. **Biochem.J.**, v. 357, n. Pt 1, p. 57-64, 2001.
43. CHANG, Y. S.; DI TOMASO, E.; MCDONALD, D. M.; JONES, R.; JAIN, R. K.; MUNN, L. L. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 97, n. 26, p. 14608-14613, 2000.
44. CHANT, L., HAIM, M., JOHNELL, O., KANIS, J., & KRECH, R. (2002). **Osteoporosis in the Workplace.** 1-20. **World Health Organization:** International Osteoporosis Foundation.

45. CHEN, X.; PLASENCIA, C.; HOU, Y.; NEAMATI, N. Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery. **J. Med Chem.**, v. 48, n. 4, p. 1098-1106, 2005.
46. CHEN, Y. P.; O'TOOLE, T. E.; SHIPLEY, T.; FORSYTH, J.; LAFLAMME, S. E.; YAMADA, K. M. et al. "Inside-out" signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 28, p. 18307-18310, 1994.
47. CHIANG, H. S.; SWAIM, M. W.; HUANG, T. F. Characterization of platelet aggregation induced by human colon adenocarcinoma cells and its inhibition by snake venom peptides, trigramin and rhodostomin. **Br. J. Haematol.**, v. 87, n. 2, p. 325-331, 1994.
48. CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.
49. CHOPRA, H.; HATFIELD, J. S.; CHANG, Y. S.; GROSSI, I. M.; FITZGERALD, L. A.; O'GARA, C. Y. et al. Role of tumor cytoskeleton and membrane glycoprotein IRGpIIb/IIIa in platelet adhesion to tumor cell membrane and tumor cell-induced platelet aggregation. **Cancer Res.**, v. 48, n. 13, p. 3787-3800, 1988.
50. CHUANG, W. J.; WU, C. H.; HUANG, H. N.; CHEN, S. H.; HSIAO, G.; LIN, C. H. et al. Comparison of the binding character of triflavin on resting and activated alpha(IIb)beta(3) integrin in human platelets by electron microscopy. **Thromb. Res.**, v. 109, n. 1, p. 37-46, 2003.
51. CLAGETT, G. P.; ANDERSON, F. A., Jr.; GEERTS, W.; HEIT, J. A.; KNUDSON, M.; LIEBERMAN, J. R. et al. Prevention of venous thromboembolism. **Chest**, v. 114, n. 5 Suppl, p. 531S-560S, 1998.
52. CLARK, E. A.; TRIKHA, M.; MARKLAND, F. S.; BRUGGE, J. S. Structurally distinct disintegrins contortrostatin and multisquamatin differentially regulate platelet tyrosine phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 35, p. 21940-21943, 1994.
53. CLEGG, D. O.; WINGERD, K. L.; HIKITA, S. T.; TOLHURST, E. C. Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. **Front Biosci.**, v. 8, p. d723-d750, 2003.
54. COELHO, A. L.; DE FREITAS, M. S.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; RAPOZO, D. C.; PINTO, L. F.; NIEWIAROWSKI, S. et al. RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. **Exp. Cell Res.**, v. 292, n. 2, p. 371-384, 2004.
55. COELHO, A. L.; DE FREITAS, M. S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; MOURA-NETO, V.; ZINGALI, R. B.; BARJA-FIDALGO, C. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. **Exp. Cell Res.**, v. 251, n. 2, p. 379-387, 1999.

56. COMINETTI, M. R.; RIBEIRO, J. U.; FOX, J. W.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with alpha5beta1 integrin. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 416, n. 2, p. 171-179, 2003.
57. COMINETTI, M. R.; TERRUGGI, C. H.; RAMOS, O. H.; FOX, J. W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M. S. et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J.Biol.Chem.**, v. 279, n. 18, p. 18247-18255, 2004.
58. Congresso Mundial de Osteoporose da IOF. **International Osteoporosis Foundation**. Seção: World Congresso on Osteoporosis. Disponível em: http://www.osteofound.org/wco/2004/index_esp.php. Acesso em: 13 de Maio de 2005.
59. COOK, J. J.; HUANG, T. F.; RUCINSKI, B.; STRZYZEWSKI, M.; TUMA, R. F.; WILLIAMS, J. A. et al. Inhibition of platelet hemostatic plug formation by trigramin, a novel RGD-peptide. **Am.J.Physiol**, v. 256, n. 4 Pt 2, p. H1038-H1043, 1989.
60. COOPER, C.; CAMPION, G.; MELTON, L. J., III. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. **Osteopros.Int.**, v. 2, n. 6, p. 285-289, 1992.
61. COPPOLINO, M. G.; DEDHAR, S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. **Int.J.Biochem.Cell Biol.**, v. 32, n. 2, p. 171-188, 2000.
62. COUCHMAN, J. R.; WOODS, A. Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. **J.Cell Sci.**, v. 112 (Pt 20), p. 3415-3420, 1999.
63. COUSIN, X.; BON, S.; MASSOULIE, J.; BON, C. Identification of a novel type of alternatively spliced exon from the acetylcholinesterase gene of *Bungarus fasciatus*. Molecular forms of acetylcholinesterase in the snake liver and muscle. **J.Biol.Chem.**, v. 273, n. 16, p. 9812-9820, 1998.
64. CROWTHER, M.; BROWN, N. J.; BISHOP, E. T.; LEWIS, C. E. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. **J.Leukoc.Biol.**, v. 70, n. 4, p. 478-490, 2001.
65. CURLEY, G. P.; BLUM, H.; HUMPHRIES, M. J. Integrin antagonists. **Cell Mol.Life Sci.**, v. 56, n. 5-6, p. 427-441, 1999.
66. Dados financeiros. **ACHÉ**. Seção: Institucional. Disponível em: <http://www.ache.com.br/>. Acesso em: 24 de Maio de 2005.
67. DALEN, J. E.; ALPERT, J. S. Natural history of pulmonary embolism. **Prog.Cardiovasc.Dis.**, v. 17, n. 4, p. 259-270, 1975.

68. DANA, N.; FATHALLAH, D. M.; ARNAOUT, M. A. Expression of a soluble and functional form of the human beta 2 integrin CD11b/CD18. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 88, n. 8, p. 3106-3110, 1991.
69. DANEN, E. H.; MARCINKIEWICZ, C.; CORNELISSEN, I. M.; VAN KRAATS, A. A.; PACHTER, J. A.; RUITER, D. J. et al. The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. **Exp.Cell Res.**, v. 238, n. 1, p. 188-196, 1998.
70. DANO, K.; ANDREASEN, P. A.; GRONDAHL-HANSEN, J.; KRISTENSEN, P.; NIELSEN, L. S.; SKRIVER, L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. **Adv.Cancer Res.**, v. 44, p. 139-266, 1985.
71. DARRIBERE, T.; SKALSKI, M.; COUSIN, H. L.; GAULTIER, A.; MONTMORY, C.; ALFANDARI, D. Integrins: regulators of embryogenesis. **Biol.Cell**, v. 92, n. 1, p. 5-25, 2000.
72. DENEKAMP, J. Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. **Br.J.Radiol.**, v. 66, n. 783, p. 181-196, 1993.
73. DENNIS, M. S.; CARTER, P.; LAZARUS, R. A. Binding interactions of kistrin with platelet glycoprotein IIb-IIIa: analysis by site-directed mutagenesis. **Proteins**, v. 15, n. 3, p. 312-321, 1993.
74. DIAZ-GONZALEZ, F.; FORSYTH, J.; STEINER, B.; GINSBERG, M. H. Trans-dominant inhibition of integrin function. **Mol.Biol.Cell**, v. 7, n. 12, p. 1939-1951, 1996.
75. **Doenças cardiovasculares no Brasil.** (1993). Coordenação de doenças cardiovasculares. 1-36. Brasília, Ministério da Saúde: Sistema Único de Saúde - SUS.
76. DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, 1998.
77. EBERHART, C. E.; COFFEY, R. J.; RADHIKA, A.; GIARDIELLO, F. M.; FERRENBACH, S.; DUBOIS, R. N. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1183-1188, 1994.
78. EDWARDS, D. R.; MURPHY, G.; REYNOLDS, J. J.; WHITHAM, S. E.; DOCHERTY, A. J.; ANGEL, P. et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. **EMBO J.**, v. 6, n. 7, p. 1899-1904, 1987.

79. ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. **J.Clin.Invest**, v. 103, n. 9, p. 1227-1230, 1999.
80. ELICEIRI, B. P. Integrin and growth factor receptor crosstalk. **Circ.Res.**, v. 89, n. 12, p. 1104-1110, 2001.
81. ELLIS, L. M.; FIDLER, I. J. Angiogenesis and metastasis. **Eur.J.Cancer**, v. 32A, n. 14, p. 2451-2460, 1996.
82. ERB, E. M.; TANGEMANN, K.; BOHRMANN, B.; MULLER, B.; ENGEL, J. Integrin alphal1b beta3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. **Biochemistry**, v. 36, n. 24, p. 7395-7402, 1997.
83. **Estimativa 2005 - Incidência de Câncer no Brasil.** (2004). 1-98. **Ministério da Saúde:** Instituto Nacional de Câncer - Coordenação de Prevenção e Vigilância.
84. FALANGA, A.; RICKLES, F. R. Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patient. **Semin.Thromb.Hemost.**, v. 25, n. 2, p. 173-182, 1999.
85. FAN, C. Y.; QIAN, Y. C.; SHEN, Y.; YANG, S. L.; GONG, Y. Molecular Cloning and Expression of the cDNA for Disintegrin from *Agkistrodon acutus*. **Sheng Wu Hua Xue.Yu Sheng Wu Wu Li Xue.Bao.(Shanghai)**, v. 31, n. 5, p. 531-536, 1999.
86. FELDING-HABERMANN, B.; HABERMANN, R.; SALDIVAR, E.; RUGGERI, Z. M. Role of beta3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. **J.Biol.Chem.**, v. 271, n. 10, p. 5892-5900, 1996.
87. FELDING-HABERMANN, B.; O'TOOLE, T. E.; SMITH, J. W.; FRANSVEA, E.; RUGGERI, Z. M.; GINSBERG, M. H. et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 98, n. 4, p. 1853-1858, 2001.
88. FIDLER, I. J.; BUCANA, C. Mechanism of tumor cell resistance to lysis by syngeneic lymphocytes. **Cancer Res.**, v. 37, n. 11, p. 3945-3956, 1977.
89. FIDLER, I. J. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. **Cancer Res.**, v. 50, n. 19, p. 6130-6138, 1990.
90. FISHER, J. E.; CAULFIELD, M. P.; SATO, M.; QUARTUCCIO, H. A.; GOULD, R. J.; GARSKY, V. M. et al. Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an "arginyl-glycyl-aspartyl" (RGD)-containing protein. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1411-1413, 1993.
91. FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. **Adv.Cancer Res.**, v. 43, p. 175-203, 1985.

92. _____. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. **N.Engl.J.Med.**, v. 333, n. 26, p. 1757-1763, 1995.
93. FOO, P. Metastasis: the journey of mobile cancer cells. **Harvard Science Rev.**, p. 30-32, 2002.
94. FRANCISCHETTI, I. M.; MY-PHAM, V.; HARRISON, J.; GARFIELD, M. K.; RIBEIRO, J. M. Bitis gabonica (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. **Gene**, v. 337, p. 55-69, 2004.
95. FRELIN, C. L. A. a. C. B. VEGF: médiateur de l'angiogenèse hypoxique. **Med Sci.**, v. 13, p. 886-891, 1997.
96. FUJII, Y.; OKUDA, D.; FUJIMOTO, Z.; HORII, K.; MORITA, T.; MIZUNO, H. Crystal structure of trimestatin, a disintegrin containing a cell adhesion recognition motif RGD. **J.Mol.Biol.**, v. 332, n. 5, p. 1115-1122, 2003.
97. GABB, H. A.; JACKSON, R. M.; STERNBERG, M. J. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. **J.Mol.Biol.**, v. 272, n. 1, p. 106-120, 1997.
98. GAROFALO, A.; CHIRIVI, R. G.; FOGLIENI, C.; PIGOTT, R.; MORTARINI, R.; MARTIN-PADURA, I. et al. Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases. **Cancer Res.**, v. 55, n. 2, p. 414-419, 1995.
99. GASIC, G. J.; GASIC, T. B.; GALANTI, N.; JOHNSON, T.; MURPHY, S. Platelet-tumor-cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. **Int.J.Cancer**, v. 11, n. 3, p. 704-718, 1973.
100. GASMI, A.; SRAIRI, N.; KAROUI, H.; EL AYEB, M. Amino acid sequence of VIF: identification in the C-terminal domain of residues common to non-hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1481, n. 1, p. 209-212, 2000.
101. GEERTS, W. H.; HEIT, J. A.; CLAGETT, G. P.; PINEO, G. F.; COLWELL, C. W.; ANDERSON, F. A., Jr. et al. Prevention of venous thromboembolism. **Chest**, v. 119, n. 1 Suppl, p. 132S-175S, 2001.
102. Genéricos crescem com novos remédios. **UNIPAR COMMERCE**. Seção: Notícias. Disponível em: <http://www.uniparcommerce.com.br/home.asp?idNoticia=1250&idSecao=noticias&idSubSecao=crpnoticias> Acesso em: 24 de Maio de 2005.
103. GEORGIU, G.; VALAX, P. Expression of correctly folded proteins in Escherichia coli. **Curr.Opin.Biotechnol.**, v. 7, n. 2, p. 190-197, 1996.

104. _____. Isolating inclusion bodies from bacteria. **Methods Enzymol.**, v. 309, p. 48-58, 1999.
105. GEORGIU, G.; TELFORD, J. N.; SHULER, M. L.; WILSON, D. B. Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or alkaline phosphatase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 52, n. 5, p. 1157-1161, 1986.
106. GIANCOTTI, F. G. ; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v. 285, n. 5430, p. 1028-1032, 1999.
107. Glaxo Smith Kline. **INTERFARMA**. Seção: Associadas. Disponível em: <http://www.interfarma.org.br/>. Acesso em: 17 de maio de 2005.
108. GOLDSMITH, H. L.; FROJMOVIC, M. M.; BRAOVAC, S.; MCINTOSH, F.; WONG, T. Adenosine diphosphate-induced aggregation of human platelets in flow through tubes: III. Shear and extrinsic fibrinogen-dependent effects. **Thromb. Haemost.**, v. 71, n. 1, p. 78-90, 1994.
109. GONG, N.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Molecular cloning, characterization and evolution of the gene encoding a new group of short-chain alpha-neurotoxins in an Australian elapid, *Pseudonaja textilis*. **FEBS Lett.**, v. 473, n. 3, p. 303-310, 2000.
110. GONG, W.; ZHU, X.; LIU, S.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*. **J. Mol. Biol.**, v. 283, n. 3, p. 657-668, 1998.
111. GOULD, R. J.; POLOKOFF, M. A.; FRIEDMAN, P. A.; HUANG, T. F.; HOLT, J. C.; COOK, J. J. et al. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 195, n. 2, p. 168-171, 1990.
112. GREENBERG, H.; RAYMOND, S. U.; LEEDER, S. R. Cardiovascular Disease And Global Health: Threat And Opportunity. **Health Aff. (Millwood.)**, 2005.
113. GRESHAM, H. D.; GOODWIN, J. L.; ALLEN, P. M.; ANDERSON, D. C.; BROWN, E. J. A novel member of the integrin receptor family mediates Arg-Gly-Asp-stimulated neutrophil phagocytosis. **J. Cell Biol.**, v. 108, n. 5, p. 1935-1943, 1989.
114. GRINSTEIN, S.; ROTIN, D.; MASON, M. J. Na⁺/H⁺ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 988, n. 1, p. 73-97, 1989.
115. GROSSI, I. M.; FITZGERALD, L. A.; UMBARGER, L. A.; NELSON, K. K.; DIGLIO, C. A.; TAYLOR, J. D. et al. Bidirectional control of membrane expression and/or activation of the tumor cell IRGpIIb/IIIa receptor and tumor cell adhesion by lipoxygenase products of arachidonic acid and linoleic acid. **Cancer Res.**, v. 49, n. 4, p. 1029-1037, 1989.

116. GUO, R. T.; CHOU, L. J.; CHEN, Y. C.; CHEN, C. Y.; PARI, K.; JEN, C. J. et al. Expression in *Pichia pastoris* and characterization by circular dichroism and NMR of rhodostomin. **Proteins**, v. 43, n. 4, p. 499-508, 2001.
117. GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Eng**, v. 4, n. 2, p. 155-161, 1990.
118. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
119. HITE, L. A.; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 308, n. 1, p. 182-191, 1994.
120. HODIVALA-DILKE, K. M.; DIPERSIO, C. M.; KREIDBERG, J. A.; HYNES, R. O. Novel roles for alpha3beta1 integrin as a regulator of cytoskeletal assembly and as a trans-dominant inhibitor of integrin receptor function in mouse keratinocytes. **J.Cell Biol.**, v. 142, n. 5, p. 1357-1369, 1998.
121. HONG, S. Y.; LEE, H.; YOU, W. K.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S.; SONG, K. The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, v. 302, n. 3, p. 502-508, 2003.
122. HONN, K. V.; TANG, D. G. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 11, n. 3-4, p. 353-375, 1992.
123. HONN, K. V.; TANG, D. G.; GAO, X.; BUTOVICH, I. A.; LIU, B.; TIMAR, J. et al. 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 13, n. 3-4, p. 365-396, 1994.
124. HONN, K. V.; TANG, D. G.; CRISSMAN, J. D. Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? **Cancer Metastasis Rev.**, v. 11, n. 3-4, p. 325-351, 1992.
125. HUANG, K. F.; CHIOU, S. H.; KO, T. P.; YUANN, J. M.; WANG, A. H. The 1.35 Å structure of cadmium-substituted TM-3, a snake-venom metalloproteinase from Taiwan habu: elucidation of a TNFalpha-converting enzyme-like active-site structure with a distorted octahedral geometry of cadmium. **Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.**, v. 58, n. Pt 7, p. 1118-1128, 2002.
126. HUGHES, P. E.; DIAZ-GONZALEZ, F.; LEONG, L.; WU, C.; MCDONALD, J. A.; SHATTIL, S. J. et al. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. **J.Biol.Chem.**, v. 271, n. 12, p. 6571-6574, 1996.

127. HUHTALA, P.; HUMPHRIES, M. J.; MCCARTHY, J. B.; TREMBLE, P. M.; WERB, Z.; DAMSKY, C. H. Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. **J.Cell Biol.**, v. 129, n. 3, p. 867-879, 1995.
128. HUMPHRIES, M. J. Integrin structure. **Biochem.Soc.Trans.**, v. 28, n. 4, p. 311-339, 2000.
129. HURSKAINEN, T. L.; HIROHATA, S.; SELDIN, M. F.; APTE, S. S. ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. **J.Biol.Chem.**, v. 274, n. 36, p. 25555-25563, 1999.
130. HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, n. 1, p. 11-25, 1992.
131. _____. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673-687, 2002.
132. IKAI, A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. **J.Biochem.(Tokyo)**, v. 88, n. 6, p. 1895-1898, 1980.
133. INCARDONA, F.; LEWALLE, J. M.; MORANDI, V.; LAMBERT, S.; LEGRAND, Y.; FOIDART, J. M. et al. Thrombospondin modulates human breast adenocarcinoma cell adhesion to human vascular endothelial cells. **Cancer Res.**, v. 55, n. 1, p. 166-173, 1995.
134. Indústria farmacêutica: Quem ganha com os genéricos. **DINHEIRO ONLINE**.
Seção: Negócios. Disponível em:
<<http://www.terra.com.br/dinheironaweb/129/negocios/neg129arisco.htm>>. Acesso em: 25 de Maio de 2005.
135. INGBER, D. E.; PRUSTY, D.; FRANGIONI, J. V.; CRAGOE, E. J., Jr.; LECHENE, C.; SCHWARTZ, M. A. Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. **J.Cell Biol.**, v. 110, n. 5, p. 1803-1811, 1990.
136. JIN, H.; VARNER, J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. **Br.J.Cancer**, v. 90, n. 3, p. 561-565, 2004.
137. JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, v. 299, n. 1-2, p. 279-291, 2002.
138. KAKKAR, A. K.; WILLIAMSON, R. C. Prevention of venous thromboembolism in cancer patients. **Semin.Thromb.Hemost.**, v. 25, n. 2, p. 239-243, 1999.

139. KANG, I. C.; KIM, D. S.; JANG, Y.; CHUNG, K. H. Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, v. 275, n. 1, p. 169-173, 2000.
140. KARPATKIN, S.; PEARLSTEIN, E.; AMBROGIO, C.; COLLER, B. S. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. **J.Clin.Invest**, v. 81, n. 4, p. 1012-1019, 1988.
141. KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S. et al. Analysis of Bothrops jararacussu venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: l-gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 211-219, 2004.
142. KATCHALSKI-KATZIR, E.; SHARIV, I.; EISENSTEIN, M.; FRIESEM, A. A.; AFLALO, C.; VAKSER, I. A. Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 89, n. 6, p. 2195-2199, 1992.
143. KIM, M.; CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. **Science**, v. 301, n. 5640, p. 1720-1725, 2003.
144. KOIVUNEN, E.; RISTIMAKI, A.; ITKONEN, O.; OSMAN, S.; VUENTO, M.; STENMAN, U. H. Tumor-associated trypsin participates in cancer cell-mediated degradation of extracellular matrix. **Cancer Res.**, v. 51, n. 8, p. 2107-2112, 1991.
145. KONSTANTOPOULOS, K.; KUKRETI, S.; MCINTIRE, L. V. Biomechanics of cell interactions in shear fields. **Adv.Drug Deliv.Rev.**, v. 33, n. 1-2, p. 141-164, 1998.
146. KORDIS, D.; GUBENSEK, F. Ammodytoxin C gene helps to elucidate the irregular structure of Crotalinae group II phospholipase A2 genes. **Eur.J.Biochem.**, v. 240, n. 1, p. 83-90, 1996.
147. KRAMER, R. H.; GONZALEZ, R.; NICOLSON, G. L. Metastatic tumor cells adhere preferentially to the extracellular matrix underlying vascular endothelial cells. **Int.J.Cancer**, v. 26, n. 5, p. 639-645, 1980.
148. KUMASAKA, T.; YAMAMOTO, M.; MORIYAMA, H.; TANAKA, N.; SATO, M.; KATSUBE, Y. et al. Crystal structure of H2-proteinase from the venom of Trimeresurus flavoviridis. **J.Biochem.(Tokyo)**, v. 119, n. 1, p. 49-57, 1996.
149. KUNZ, M.; IBRAHIM, S. M. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. **Mol.Cancer**, v. 2, p. 23, 2003.
150. KURZ, K. D.; MAIN, B. W.; SANDUSKY, G. E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. **Thromb.Res.**, v. 60, n. 4, p. 269-280, 1990.

151. KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J.Mol.Biol.**, v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982.
152. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
153. LAFLAMME, S. E. ; AUER, K. L. Integrin signaling. **Semin.Cancer Biol.**, v. 7, n. 3, p. 111-118, 1996.
154. LAFRENIE, R. M.; GALLO, S.; PODOR, T. J.; BUCHANAN, M. R.; ORR, F. W. The relative roles of vitronectin receptor, E-selectin and alpha 4 beta 1 in cancer cell adhesion to interleukin-1-treated endothelial cells. **Eur.J.Cancer**, v. 30A, n. 14, p. 2151-2158, 1994.
155. LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J.Appl.Cryst.**, v. 26, p. 283-291, 1993.
156. LEE, A. Y. Cancer and thromboembolic disease: pathogenic mechanisms. **Cancer Treat.Rev.**, v. 28, n. 3, p. 137-140, 2002.
157. LEON, C.; HECHLER, B.; FREUND, M.; ECKLY, A.; VIAL, C.; OHLMANN, P. et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. **J.Clin.Invest**, v. 104, n. 12, p. 1731-1737, 1999.
158. LEVINE, M. N.; LEE, A. Y.; KAKKAR, A. K. From Trousseau to targeted therapy: new insights and innovations in thrombosis and cancer. **J.Thromb.Haemost.**, v. 1, n. 7, p. 1456-1463, 2003.
159. LI, R.; CHEN, X.; GONG, B.; SELZER, P. M.; LI, Z.; DAVIDSON, E. et al. Structure-based design of parasitic protease inhibitors. **Bioorg.Med Chem.**, v. 4, n. 9, p. 1421-1427, 1996.
160. LINDBERG, F. P.; GRESHAM, H. D.; REINHOLD, M. I.; BROWN, E. J. Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. **J.Cell Biol.**, v. 134, n. 5, p. 1313-1322, 1996.
161. LIU, C. H.; CHANG, S. H.; NARKO, K.; TRIFAN, O. C.; WU, M. T.; SMITH, E. et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. **J.Biol.Chem.**, v. 276, n. 21, p. 18563-18569, 2001.
162. LIU, Y.; LUSCOMBE, N. M.; ALEXANDROV, V.; BERTONE, P.; HARRISON, P.; ZHANG, Z. et al. Structural genomics: a new era for pharmaceutical research. **Genome Biol.**, v. 3, n. 2, p. REPORTS40042002.

163. MAJURI, M. L.; HAKKARAINEN, M.; PAAVONEN, T.; RENKONEN, R. Carcinoembryonic antigen is expressed on endothelial cells. A putative mediator of tumor cell extravasation and metastasis. **APMIS**, v. 102, n. 6, p. 432-438, 1994.
164. MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, M. M.; RAIDA, M.; VIJAY-KUMAR, S.; HUANG, Z. et al. EC3, a novel heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus* venom, inhibits alpha4 and alpha5 integrins in an RGD-independent manner. **J.Biol.Chem.**, v. 274, n. 18, p. 12468-12473, 1999.
165. MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J. J.; VIJAY-KUMAR, S.; MARCINKIEWICZ, M. M.; RAIDA, M.; SCHICK, P. et al. Structural and functional characterization of EMF10, a heterodimeric disintegrin from *Eristocophis macmahoni* venom that selectively inhibits alpha 5 beta 1 integrin. **Biochemistry**, v. 38, n. 40, p. 13302-13309, 1999.
166. MARCINKIEWICZ, C.; ROSENTHAL, L. A.; MARCINKIEWICZ, M. M.; KOWALSKA, M. A.; NIEWIAROWSKI, S. One-step affinity purification of recombinant alphavbeta3 integrin from transfected cells. **Protein Expr.Purif.**, v. 8, n. 1, p. 68-74, 1996.
167. MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; MCLANE, M. A.; NIEWIAROWSKI, S. Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of alphaIIb beta3 and alpha(v) beta3 integrins and expression of ligand-induced binding site. **Blood**, v. 90, n. 4, p. 1565-1575, 1997.
168. MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A. L.; TERRUGGI, C. H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARJA-FIDALGO, C.; DE FREITAS, M. S. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur.J.Biochem.**, v. 270, n. 24, p. 4799-4808, 2003.
169. MARSTON, F. A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. **Biochem.J.**, v. 240, n. 1, p. 1-12, 1986.
170. MATSUNO, H.; KOZAWA, O.; NAGASHIMA, S.; KANAMARU, M.; UEMATSU, T. Comparative antiplatelet effects of aspirin, vapirost and GR144053, a GPIIb/IIIa antagonist, with a special reference to the role of platelet microaggregates. **Br.J.Pharmacol.**, v. 127, n. 5, p. 1129-1134, 1999.
171. MCLANE, M. A.; KUCHAR, M. A.; BRANDO, C.; SANTOLI, D.; PAQUETTE-STRAUB, C. A.; MIELE, M. E. New insights on disintegrin-receptor interactions: eristostatin and melanoma cells. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 177-182, 2001.
172. MCLANE, M. A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S. Viper venom disintegrins and related molecules. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v. 219, n. 2, p. 109-119, 1998.
173. MCLANE, M. A.; SANCHEZ, E. E.; WONG, A.; PAQUETTE-STRAUB, C.; PEREZ, J. C. Disintegrins. **Curr.Drug Targets.Cardiovasc.Haematol.Disord.**, v. 4, n. 4, p. 327-355, 2004.

174. MENTER, D. G.; SLOANE, B. F.; STEINERT, B. W.; ONODA, J.; CRAIG, R.; HARKINS, C. et al. Platelet enhancement of tumor cell adhesion to subendothelial matrix: role of platelet cytoskeleton and platelet membrane. **J.Natl.Cancer Inst.**, v. 79, n. 5, p. 1077-1090, 1987.
175. Merck Sharp & Dohme. **INTERFARMA**. Seção: Associadas. Disponível em: <http://www.interfarma.org.br/>. Acesso em: 17 de Maio de 2005.
176. MICHISHITA, M.; VIDEM, V.; ARNAOUT, M. A. A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. **Cell**, v. 72, n. 6, p. 857-867, 1993.
177. MIELICKI, W. P. ; GORDON, S. G. Three-stage chromogenic assay for the analysis of activation properties of factor X by cancer procoagulant. **Blood Coagul.Fibrinolysis**, v. 4, n. 3, p. 441-446, 1993.
178. MIZEJEWSKI, G. J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v. 222, n. 2, p. 124-138, 1999.
179. MORRELL, M. T.; DUNNILL, M. S. The post-mortem incidence of pulmonary embolism in a hospital population. **Br.J.Surg.**, v. 55, n. 5, p. 347-352, 1968.
180. MOURA-DA-SILVA, A. M.; LINICA, A.; DELLA-CASA, M. S.; KAMIGUTI, A. S.; HO, P. L.; CRAMPTON, J. M. Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: expression in escherichia coli and inhibition of the platelet-collagen interaction. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 369, n. 2, p. 295-301, 1999.
181. MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D.; BUCHANAN, M. E. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 50-56, 2001.
182. MULLER-DECKER, K.; NEUFANG, G.; BERGER, I.; NEUMANN, M.; MARKS, F.; FURSTENBERGER, G. Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 99, n. 19, p. 12483-12488, 2002.
183. MUSIAL, J.; NIEWIAROWSKI, S.; RUCINSKI, B.; STEWART, G. J.; COOK, J. J.; WILLIAMS, J. A. et al. Inhibition of platelet adhesion to surfaces of extracorporeal circuits by disintegrins. RGD-containing peptides from viper venoms. **Circulation**, v. 82, n. 1, p. 261-273, 1990.
184. NAGY, J. A.; BROWN, L. F.; SENGER, D. R.; LANIR, N.; VAN DE, W. L.; DVORAK, A. M. et al. Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 948, n. 3, p. 305-326, 1989.
185. NAKAJIMA, M.; MORIKAWA, K.; FABRA, A.; BUCANA, C. D.; FIDLER, I. J. Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of

- human colon carcinoma cells. **J.Natl.Cancer Inst.**, v. 82, n. 24, p. 1890-1898, 1990.
186. NAKAJIMA, M.; WELCH, D. R.; BELLONI, P. N.; NICOLSON, G. L. Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. **Cancer Res.**, v. 47, n. 18, p. 4869-4876, 1987.
187. NEMERSON, Y. The tissue factor pathway of blood coagulation. **Semin.Hematol.**, v. 29, n. 3, p. 170-176, 1992.
188. NIERODZIK, M. L.; PLOTKIN, A.; KAJUMO, F.; KARPATKIN, S. Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. **J.Clin.Invest**, v. 87, n. 1, p. 229-236, 1991.
189. NIEWIAROWSKI, S.; MCLANE, M. A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G. J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin.Hematol.**, v. 31, n. 4, p. 289-300, 1994.
190. NIKAI, T.; TANIGUCHI, K.; KOMORI, Y.; MASUDA, K.; FOX, J. W.; SUGIHARA, H. Primary structure and functional characterization of bilitoxin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 378, n. 1, p. 6-15, 2000.
191. OKUDA, D.; MORITA, T. Purification and characterization of a new RGD/KGD-containing dimeric disintegrin, piscivostatin, from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*: the unique effect of piscivostatin on platelet aggregation. **J.Biochem.(Tokyo)**, v. 130, n. 3, p. 407-415, 2001.
192. OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochemistry**, v. 41, n. 48, p. 14248-14254, 2002.
193. OLEKSOWICZ, L.; MROWIEC, Z.; SCHWARTZ, E.; KHORSHIDI, M.; DUTCHER, J. P.; PUSZKIN, E. Characterization of tumor-induced platelet aggregation: the role of immunorelated GPIb and GPIIb/IIIa expression by MCF-7 breast cancer cells. **Thromb.Res.**, v. 79, n. 3, p. 261-274, 1995.
194. ORR, F. W.; WANG, H. H.; LAFRENIE, R. M.; SCHERBARTH, S.; NANCE, D. M. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. **J.Pathol.**, v. 190, n. 3, p. 310-329, 2000.
195. ORTIZ-STERM, A.; ROSALES, C. Cross-talk between Fc receptors and integrins. **Immunol.Lett.**, v. 90, n. 2-3, p. 137-143, 2003.
196. PAAVONEN, T.; TIISALA, S.; MAJURI, M. L.; BOHLING, T.; RENKONEN, R. In vivo evidence of the role of alpha 4 beta 1-VCAM-1 interaction in sarcoma, but not in carcinoma extravasation. **Int.J.Cancer**, v. 58, n. 2, p. 298-302, 1994.

197. PACIFICI, R.; ROMAN, J.; KIMBLE, R.; CIVITELLI, R.; BROWNFIELD, C. M.; BIZZARRI, C. Ligand binding to monocyte alpha 5 beta 1 integrin activates the alpha 2 beta 1 receptor via the alpha 5 subunit cytoplasmic domain and protein kinase C. **J.Immunol.**, v. 153, n. 5, p. 2222-2233, 1994.
198. PARISE, L. V.; LEE, J.; JULIANO, R. L. New aspects of integrin signaling in cancer. **Semin.Cancer Biol.**, v. 10, n. 6, p. 407-414, 2000.
199. PARK, D.; KANG, I.; KIM, H.; CHUNG, K.; KIM, D. S.; YUN, Y. Cloning and characterization of novel disintegrins from Agkistrodon halys venom. **Mol.Cells**, v. 8, n. 5, p. 578-584, 1998.
200. PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J.Clin.**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.
201. PAZ MORENO-MURCIANO, M.; MONLEON, D.; MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J. J.; CELDA, B. NMR solution structure of the non-RGD disintegrin obtustatin. **J.Mol.Biol.**, v. 329, n. 1, p. 135-145, 2003.
202. PECHEUR, I.; PEYRUCHAUD, O.; SERRE, C. M.; GUGLIELMI, J.; VOLAND, C.; BOURRE, F. et al. Integrin alpha(v)beta3 expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. **FASEB J.**, v. 16, n. 10, p. 1266-1268, 2002.
203. PETRUZZELLI, L.; TAKAMI, M.; HUMES, H. D. Structure and function of cell adhesion molecules. **Am.J.Med.**, v. 106, n. 4, p. 467-476, 1999.
204. Pfizer. **INTERFARMA**. Seção: Associadas. Disponível em: <<http://www.interfarma.org.br/>>. Acesso em: 17 de Maio de 2005.
205. PIJUAN-THOMPSON, V.; GLADSON, C. L. Ligation of integrin alpha5beta1 is required for internalization of vitronectin by integrin alphavbeta3. **J.Biol.Chem.**, v. 272, n. 5, p. 2736-2743, 1997.
206. Pivetta, M (2004). Câncer esperanças divididas. *Pesquisa FAPESP*, 99 , 48-53.
Ref ID: 193
Reprint: Not in File
207. PLOW, E. F.; HAAS, T. A.; ZHANG, L.; LOFTUS, J.; SMITH, J. W. Ligand binding to integrins. **J.Biol.Chem.**, v. 275, n. 29, p. 21785-21788, 2000.
208. PORTER, J. C.; HOGG, N. Integrin cross talk: activation of lymphocyte function-associated antigen-1 on human T cells alters alpha4beta1- and alpha5beta1-mediated function. **J.Cell Biol.**, v. 138, n. 6, p. 1437-1447, 1997.

209. POTTER, R. F.; GROOM, A. C. Capillary diameter and geometry in cardiac and skeletal muscle studied by means of corrosion casts. **Microvasc.Res.**, v. 25, n. 1, p. 68-84, 1983.
210. **Prevention of venous thromboembolism.** (1997). 1. International Consensus Statement (guidelines according to scientific evidence). *Int.Angiol.* 16[1], 3-38.
211. QIAN, F.; BAJKOWSKI, A. S.; STEINER, D. F.; CHAN, S. J.; FRANKFATER, A. Expression of five cathepsins in murine melanomas of varying metastatic potential and normal tissues. **Cancer Res.**, v. 49, n. 17, p. 4870-4875, 1989.
212. RAHMAN, S.; AITKEN, A.; FLYNN, G.; FORMSTONE, C.; SAVIDGE, G. F. Modulation of RGD sequence motifs regulates disintegrin recognition of α IIb β 3 and α 5 β 1 integrin complexes. Replacement of elegantin alanine-50 with proline, N-terminal to the RGD sequence, diminishes recognition of the α 5 β 1 complex with restoration induced by Mn^{2+} cation. **Biochem.J.**, v. 335 (Pt 2), p. 247-257, 1998.
213. RAY S, CHATTOPADHYAY N, BISWAS N, CHATTERJEE A. Regulatory molecules in tumor metastasis. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.** v. 18, n. 4, p. 251-259, 1999.
214. REICH, R.; THOMPSON, E. W.; IWAMOTO, Y.; MARTIN, G. R.; DEASON, J. R.; FULLER, G. C. et al. Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells. **Cancer Res.**, v. 48, n. 12, p. 3307-3312, 1988.
215. Retail Pharmacy Sales, 12 months to March 2005. **IMS HEALTH.** Seção: Sales through retail pharmacies. Disponível em: <http://open.imshealth.com/>. Acesso em: 5 de Junho de 2005.
216. RESTUCCI, B.; DE VICO, G.; P. MAIOLINO. Evaluation of Angiogenesis in Canine Mammary Tumors by Quantitative Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule Immunohistochemistry. **Vet Pathol.**, v. 37, n. 4, p. 297-301, 2000.
217. RICKLES, F. R.; LEVINE, M.; EDWARDS, R. L. Hemostatic alterations in cancer patients. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 11, n. 3-4, p. 237-248, 1992.
218. RIEDERER, M. A.; GINSBERG, M. H.; STEINER, B. Blockade of platelet GPIIb-IIIa (Integrin α IIb β 3) in flowing human blood leads to passivation of prothrombotic surfaces. **Thromb.Haemost.**, v. 88, n. 5, p. 858-864, 2002.
219. RITTER, M. R.; MARKLAND, F. S., Jr. Differential regulation of tyrosine phosphorylation in tumor cells by contortrostatin, a homodimeric disintegrin, and monomeric disintegrins echistatin and flavoridin. **Toxicon**, v. 39, n. 2-3, p. 283-289, 2001.

220. RITTER, M. R.; ZHOU, Q.; MARKLAND, F. S., Jr. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, induces alphavbeta3-mediated tyrosine phosphorylation of CAS and FAK in tumor cells. **J.Cell Biochem.**, v. 79, n. 1, p. 28-37, 2000.
221. ROJAS, A. I.; AHMED, A. R. Adhesion receptors in health and disease. **Crit Rev.Oral Biol.Med**, v. 10, n. 3, p. 337-358, 1999.
222. ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano. In: B.SOERENSEN. **Animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1990. p. 1-45.
223. ROYDS, J. A.; DOWER, S. K.; QWARNSTROM, E. E.;LEWIS, C. E. Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFkB. **Mol.Pathol.**, v. 51, n. 2, p. 55-61, 1998.
224. ROSS, R. S. Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. **Cardiovasc.Res.**, v. 63, n. 3, p. 381-390, 2004.
225. ROZHIN, J.; GOMEZ, A. P.; ZIEGLER, G. H.; NELSON, K. K.; CHANG, Y. S.; FONG, D. et al. Cathepsin B to cysteine proteinase inhibitor balance in metastatic cell subpopulations isolated from murine tumors. **Cancer Res.**, v. 50, n. 19, p. 6278-6284, 1990.
226. RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.;GUTIERREZ, J. M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from Bothrops asper (Terciopelo) snake venom. **Exp.Mol.Pathol.**, v. 63, n. 3, p. 186-199, 1995.
227. RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **J.Cell Mol.Med**, v. 9, n. 2, p. 267-285, 2005.
228. RUEGG, C.; DORMOND, O.;MARIOTTI, A. Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1654, n. 1, p. 51-67, 2004.
229. RUIZ, P.; DUNON, D.; SONNENBERG, A.;IMHOF, B. A. Suppression of mouse melanoma metastasis by EA-1, a monoclonal antibody specific for alpha 6 integrins. **Cell Adhes.Commun.**, v. 1, n. 1, p. 67-81, 1993.
230. RUOSLAHTI, E.; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **Cell**, v. 64, n. 5, p. 867-869, 1991.
231. SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J.Mol.Biol.**, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.
232. SALI, A. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Mol.Med Today**, v. 1, n. 6, p. 270-277, 1995.

233. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2nd Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
234. SAUDEK, V.; ATKINSON, R. A.; PELTON, J. T. Three-dimensional structure of echistatin, the smallest active RGD protein. **Biochemistry**, v. 30, n. 30, p. 7369-7372, 1991.
235. SCHLECHTE, W.; MURANO, G.; BOYD, D. Examination of the role of the urokinase receptor in human colon cancer mediated laminin degradation. **Cancer Res.**, v. 49, n. 21, p. 6064-6069, 1989.
236. SENN, H.; KLAUS, W. The nuclear magnetic resonance solution structure of flavoridin, an antagonist of the platelet GP IIb-IIIa receptor. **J.Mol.Biol.**, v. 232, n. 3, p. 907-925, 1993.
237. SHEBUSKI, R. J.; RAMJIT, D. R.; BENCEN, G. H.; POLOKOFF, M. A. Characterization and platelet inhibitory activity of bitistatin, a potent arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide from the venom of the viper *Bitis arietans*. **J.Biol.Chem.**, v. 264, n. 36, p. 21550-21556, 1989.
238. SHESKI, F. D.; NATARAJAN, V.; POTTRATZ, S. T. Tumor necrosis factor-alpha stimulates attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. **J.Lab Clin.Med.**, v. 133, n. 3, p. 265-273, 1999.
239. SHEU, J. R.; LIN, C. H.; PENG, H. C.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide, inhibits tumor cell-induced platelet aggregation. **Jpn.J.Cancer Res.**, v. 84, n. 10, p. 1062-1071, 1993.
240. SHEU, J. R.; YEN, M. H.; KAN, Y. C.; HUNG, W. C.; CHANG, P. T.; LUK, H. N. Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1336, n. 3, p. 445-454, 1997.
241. SHEU, J. R.; YEN, M. H.; PENG, H. C.; CHANG, M. C.; HUANG, T. F. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide, prevents platelet plug formation in in vivo experiments. **Eur.J.Pharmacol.**, v. 294, n. 1, p. 231-238, 1995.
242. SHIN, J.; HONG, S. Y.; CHUNG, K.; KANG, I.; JANG, Y.; KIM, D. S. et al. Solution structure of a novel disintegrin, salmosin, from *Agkistrodon halys* venom. **Biochemistry**, v. 42, n. 49, p. 14408-14415, 2003.
243. SIIGUR, E.; AASPOLLU, A.; SIIGUR, J. Sequence diversity of *Vipera lebetina* snake venom gland serine proteinase homologs--result of alternative-splicing or genome alteration. **Gene**, v. 263, n. 1-2, p. 199-203, 2001.
244. SIMON, K. O.; NUTT, E. M.; ABRAHAM, D. G.; RODAN, G. A.; DUONG, L. T. The alpha5beta3 integrin regulates alpha5beta1-mediated cell migration toward fibronectin. **J.Biol.Chem.**, v. 272, n. 46, p. 29380-29389, 1997.

245. SLATTERY, M. J.; DONG, C. Neutrophils influence melanoma adhesion and migration under flow conditions. **Int.J.Cancer**, v. 106, n. 5, p. 713-722, 2003.
246. SMITH, K. J.; JASEJA, M.; LU, X.; WILLIAMS, J. A.; HYDE, E. I.; TRAYER, I. P. Three-dimensional structure of the RGD-containing snake toxin albolabrin in solution, based on ¹H NMR spectroscopy and simulated annealing calculations. **Int.J.Pept.Protein Res.**, v. 48, n. 3, p. 220-228, 1996.
247. SORENSEN, H. P. ; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. **Microb.Cell Fact.**, v. 4, n. 1, p. 12005.
248. SOUZA, D. H.; IEMMA, M. R.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, R. B. et al. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 384, n. 2, p. 341-350, 2000.
249. STEIN, P. D.; HENRY, J. W. Prevalence of acute pulmonary embolism among patients in a general hospital and at autopsy. **Chest**, v. 108, n. 4, p. 978-981, 1995.
250. STEINBACH, F.; TANABE, K.; ALEXANDER, J.; EDINGER, M.; TUBBS, R.; BRENNER, W. et al. The influence of cytokines on the adhesion of renal cancer cells to endothelium. **J.Urol.**, v. 155, n. 2, p. 743-748, 1996.
251. SUZUKI, S.; NAITOH, Y. Amino acid sequence of a novel integrin beta 4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. **EMBO J.**, v. 9, n. 3, p. 757-763, 1990.
252. SWENSON, S.; BUSH, L. R.; MARKLAND, F. S. Chimeric derivative of fibrolase, a fibrinolytic enzyme from southern copperhead venom, possesses inhibitory activity on platelet aggregation. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 384, n. 2, p. 227-237, 2000.
253. SWENSON, S.; COSTA, F.; MINEA, R.; SHERWIN, R. P.; ERNST, W.; FUJII, G. et al. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. **Mol.Cancer Ther.**, v. 3, n. 4, p. 499-511, 2004.
254. TAMAKI, M.; AOYAGI, M.; MORITA, I.; HIRAKAWA, K.; MUROTA, S. Cell adhesion molecules acting between C6 glioma and endothelial cells. **J.Neurooncol.**, v. 24, n. 2, p. 181-188, 1995.
255. TANG, B. L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. **Int.J.Biochem.Cell Biol.**, v. 33, n. 1, p. 33-44, 2001.
256. TOMATIS, D.; ECHTERMAYER, F.; SCHOBER, S.; BALZAC, F.; RETTA, S. F.; SILENGO, L. The muscle-specific laminin receptor alpha7 beta1 integrin negatively regulates alpha5 beta1 fibronectin receptor function. **Exp.Cell Res.**, v. 246, n. 2, p. 421-432, 1999.

257. TOMITA, Y.; SAITO, T.; SAITO, K.; OITE, T.; SHIMIZU, F.; SATO, S. Possible significance of VLA-4 (alpha 4 beta 1) for hematogenous metastasis of renal-cell cancer. **Int.J.Cancer**, v. 60, n. 6, p. 753-758, 1995.
258. TOZAWA, K.; SAKURADA, S.; KOHRI, K.; OKAMOTO, T. Effects of anti-nuclear factor kappa B reagents in blocking adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells. **Cancer Res.**, v. 55, n. 18, p. 4162-4167, 1995.
259. TRIKHA, M.; DE CLERCK, Y. A.; MARKLAND, F. S. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits beta 1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. **Cancer Res.**, v. 54, n. 18, p. 4993-4998, 1994.
260. TSOPANOGLIOU, N. E.; MARAGOUDAKIS, M. E. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. **Semin.Thromb.Hemost.**, v. 30, n. 1, p. 63-69, 2004.
261. TUXHORN, J. A.; MCALHANY, S. J.; DANG, T. D.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. **Cancer Res.**, v. 62, n. 11, p. 3298-3307, 2002.
262. VALAX, P.; GEORGIIOU, G. Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in Escherichia coli. 1. Composition. **Biotechnol.Prog.**, v. 9, n. 5, p. 539-547, 1993.
263. VAN KOOYK, Y.; VAN DE WIEL-VAN KEMENADE; WEDER, P.; HUIJBENS, R. J.; FIGDOR, C. G. Lymphocyte function-associated antigen 1 dominates very late antigen 4 in binding of activated T cells to endothelium. **J.Exp.Med.**, v. 177, n. 1, p. 185-190, 1993.
264. VON ITZSTEIN, M.; WU, W. Y.; KOK, G. B.; PEGG, M. S.; DYASON, J. C.; JIN, B. et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. **Nature**, v. 363, n. 6428, p. 418-423, 1993.
265. VRIEND, G. A molecular modeling and drug design program. **J.Mol.Graph.**, v. 8, p. 52-56, 1990.
266. WANG, J. H.; WU, Y.; REN, F.; LU, L.; ZHAO, B. C. Cloning and characterization of Adinbitor, a novel disintegrin from the snake venom of Agkistrodon halys brevicaudus stejneger. **Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai)**, v. 36, n. 6, p. 425-429, 2004.
267. WATANABE, L.; SHANNON, J. D.; VALENTE, R. H.; RUCAVADO, A.; ALAPE-GIRON, A.; KAMIGUTI, A. S. et al. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from Bothrops asper snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein Sci.**, v. 12, n. 10, p. 2273-2281, 2003.

268. WEINBERG, R. A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 49, n. 14, p. 3713-3721, 1989.
269. WEISS, L.; ORR, F. W.; HONN, K. V. Interactions between cancer cells and the microvasculature: a rate-regulator for metastasis. **Clin.Exp.Metastasis**, v. 7, n. 2, p. 127-167, 1989.
270. WERB, Z.; HEMBRY, R. M.; MURPHY, G.; AGGELER, J. Commitment to expression of the metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. **J.Cell Biol.**, v. 102, n. 3, p. 697-702, 1986.
271. WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S.; MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, M. M.; MCLANE, M. A. Structural requirements of echistatin for the recognition of alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. **J.Biol.Chem.**, v. 274, n. 53, p. 37809-37814, 1999.
272. WOJTUKIEWICZ, M. Z.; TANG, D. G.; CIARELLI, J. J.; NELSON, K. K.; WALZ, D. A.; DIGLIO, C. A. et al. Thrombin increases the metastatic potential of tumor cells. **Int.J.Cancer**, v. 54, n. 5, p. 793-806, 1993.
273. WOLFSBERG, T. G.; WHITE, J. M. ADAMs in fertilization and development. **Dev.Biol.**, v. 180, n. 2, p. 389-401, 1996.
274. WOODS, A.; COUCHMAN, J. R. Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. **Trends Cell Biol.**, v. 8, n. 5, p. 189-192, 1998.
275. _____. Integrin modulation by lateral association. **J.Biol.Chem.**, v. 275, n. 32, p. 24233-24236, 2000.
276. XIONG, J. P.; STEHLE, T.; DIEFENBACH, B.; ZHANG, R.; DUNKER, R.; SCOTT, D. L. et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. **Science**, v. 294, n. 5541, p. 339-345, 2001.
277. XIONG, J. P.; STEHLE, T.; ZHANG, R.; JOACHIMIAK, A.; FRECH, M.; GOODMAN, S. L. et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. **Science**, v. 296, n. 5565, p. 151-155, 2002.
278. XUE, W.; MIZUKAMI, I.; TODD, R. F., III; PETTY, H. R. Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with beta1 and beta3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components. **Cancer Res.**, v. 57, n. 9, p. 1682-1689, 1997.
279. YAHALOM, D.; WITTELSBERGER, A.; MIERKE, D. F.; ROSENBLATT, M.; ALEXANDER, J. M.; CHOREV, M. Identification of the principal binding site for RGD-containing ligands in the alpha(V)beta(3) integrin: a photoaffinity cross-linking study. **Biochemistry**, v. 41, n. 26, p. 8321-8331, 2002.

280. YEH, C. H.; PENG, H. C.; HUANG, T. F. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin alphavbeta3 antagonist and inducing apoptosis. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3268-3276, 1998.
281. ZABAGLIA, S.F.C.; PINTO-NETO, A.M.; COSTA-PAIVA, L.H.S. Is Tubal Ligation a Risk Factor for a Reduction of Bone Mineral Density in Postmenopausal Women? **Rev.Bras.Ginecol.Obstet.** v. 23, n. 20, p. 621-626, 2001.
282. ZETTER, B. R. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. **N.Engl.J.Med.**, v. 322, n. 9, p. 605-612, 1990.
283. ZHANG, D.; BOTOS, I.; GOMIS-RUTH, F. X.; DOLL, R.; BLOOD, C.; NJOROGE, F. G. et al. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form d). **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 91, n. 18, p. 8447-8451, 1994.
284. ZHANG, Y.; LEE, W. H.; GAO, R.; XIONG, Y. L.; WANG, W. Y.; ZHU, S. W. Effects of Pallas' viper (*Agkistrodon halys pallas*) venom on blood coagulation and characterization of a prothrombin activator. **Toxicon**, v. 36, n. 1, p. 143-152, 1998.
285. ZHOU, Q.; HU, P.; RITTER, M. R.; SWENSON, S. D.; ARGOUNOVA, S.; EPSTEIN, A. L. et al. Molecular cloning and functional expression of contortrostatin, a homodimeric disintegrin from southern copperhead snake venom. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 375, n. 2, p. 278-288, 2000.
286. ZHOU, Q.; NAKADA, M. T.; ARNOLD, C.; SHIEH, K. Y.; MARKLAND, F. S., Jr. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits angiogenesis. **Angiogenesis.**, v. 3, n. 3, p. 259-269, 1999.
287. ZHOU, Q.; NAKADA, M. T.; BROOKS, P. C.; SWENSON, S. D.; RITTER, M. R.; ARGOUNOVA, S. et al. Contortrostatin, a homodimeric disintegrin, binds to integrin alphavbeta5. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, v. 267, n. 1, p. 350-355, 2000.
288. ZHU, X.; TENG, M.; NIU, L. Structure of acutolysin-C, a haemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon acutus*, providing further evidence for the mechanism of the pH-dependent proteolytic reaction of zinc metalloproteinases. **Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.**, v. 55, n. 11, p. 1834-1841, 1999.
289. ZIGRINO, P.; KAMIGUTI, A. S.; EBLE, J.; DRESCHER, C.; NISCHT, R.; FOX, J. W. et al. The reprotolysin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. **J.Biol.Chem.**, v. 277, n. 43, p. 40528-40535, 2002.
290. ZOCCHI, M. R.; VIDAL, M.; POGGI, A. Involvement of CD56/N-CAM molecule in the adhesion of human solid tumor cell lines to endothelial cells. **Exp.Cell Res.**, v. 204, n. 1, p. 130-135, 1993.

9. ANEXOS

9.1. MÉTODOS AMPLAMENTE DIFUNDIDOS

9.1.1. Eletroforese em gel de agarose

As soluções de DNAs foram analisadas por meio de eletroforese em gel agarose (seção Anexos: “Géis”) e reveladas com brometo de etídio conforme previamente descrito (SAMBROOK, FRITSCH, & MANIATIS, 1989), utilizando um transiluminador UV em comprimento de onda igual a 302nm.

Também foram utilizados géis alcalinos de agarose para procedimentos de auto-radiografia, visto que a formação de voltas estruturais nas amostras de DNA (“*Hair pins*”) e o espalhamento da radioatividade observado em géis de agarose convencionais geralmente prejudicam a interpretação dos resultados.

As imagens foram digitalizadas utilizando uma câmera (Kodak DC120) e analisadas com o programa Kodak Digital Science 1D.

9.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A expressão e purificação foram acompanhadas por eletroforese em gel contendo 15% de poliacrilamida (ver seção “Géis” em anexo) em condições desnaturantes (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970).

As bandas protéicas foram reveladas utilizando Brilliant Blue R250 como corante.

9.1.3. Eletroforese em gel de tricina

Para a verificação da pureza das frações obtidas foram conduzidas eletroforeses com maior resolução para proteínas de baixa massa molecular. Géis contendo tricina (Subseções: 9.3 e 9.4) foram utilizados para a separação das bandas protéicas e verificação da homogeneidade das frações obtidas na etapa de gel filtração.

As bandas protéicas foram reveladas utilizando Brilliant Blue R250 como corante.

9.1.4. Monitoramento do isolamento de mRNAs

A obtenção dos mRNAs foi monitorada quanto ao grau de pureza e concentração. O grau de pureza foi estimado através da relação entre as absorbâncias à 260nm e 280nm, após diluição da solução de RNA obtida (totais ou mensageiros) em água deionizada estéril.

A mesma solução serviu para a determinação da concentração, estimada pela equação abaixo:

$$[\text{RNA}] = \text{D.O.} \times \text{Fator de Diluição} \times \text{Fator de correção}$$

onde,

[RNA]: Concentração de RNA na solução testada.

D.O.: Absorbância da solução a 260nm.

Fator de diluição: Número de vezes que a solução de RNA foi diluída para a obtenção do volume final (Ex. 4µl da solução de RNA em 996 µl de água resulta em um fator de diluição igual a 250).

Fator de correção: Número constante inerente à solução de RNA para cálculos de concentração (no caso do comprimento de onda igual a 260nm o valor é igual a 40).

Outra forma utilizada para o monitoramento da extração dos RNAs foi a eletroforese em gel de agarose desnaturantes contendo formaldeído (Subseção: 9.3). Tal metodologia permite verificar a integridade das espécies moleculares obtidas. Nessa técnica, amostras de 5 μ l dos RNAs foram secas utilizando um evaporador a vácuo, ressuspensas em tampão de amostra de RNA (Subseção: 9.4) e submetidas a separação eletroforética.

9.1.5. Preparação de células competentes

1) Inocular colônia em 5ml de meio 2x YT ou LB (ambos os casos sem antibiótico), incubar em 250rpm durante a noite (37°C).

2) Diluir o inoculo crescido em 2x YT ou LB (ambos os casos sem antibiótico) e incubar em 250rpm até que a D.O._{660nm} da cultura situe-se entre 0,4 e 0,6, 37°C.

3) Distribuir a cultura crescida em quatro microtúbulos (1,5ml/tubo), centrifugar a 2300rpm, 10 minutos, 4°C.

4) Desprezar sobrenadantes, ressuspender as células com 500 μ l/tubo de solução de CaCl₂ 50 mM (4°C). Transferir para dois tubos e deixar no gelo por 30 minutos.

5) Centrifugar a 2300rpm por 5 minutos à 4°C. Desprezar o sobrenadante e cuidadosamente ressuspensa com CaCl₂ 50 mM à 4°C (210 μ l/tubo).

6) Usar após 24 horas. (Manter no gelo no máximo quatro dias).

9.1.6. Transformação de células competentes

1) Em microtúbulo estéril gelado adicionar 1 μ l DNA plasmidial e 50 μ l de células competentes. Manter no gelo por 30 minutos. Se o DNA plasmidial for proveniente de reação de ligação utilizar sempre a proporção 1:10:40 (Volume da reação de ligação:Volume de células competentes:Volume de LB).

2) Transferir as células rapidamente para um banho a 42°C e incubar por exatamente 45 segundos (choque térmico). Resfriar no gelo por 2 minutos.

3) Adicionar 200 μ l de meio LB em temperatura ambiente. Incubar sob agitação por 1 hora, 37°C.

4) Inocular 100-200 μ l de cada reação de transformação em placas de LB sólido contendo antibiótico. Incubar a 37°C durante a noite.

5) Incluir um controle de células transformadas e não transformadas em meio seletivo.

9.2. MEIOS DE CULTURA

Aos meios abaixo relacionados, quando devidamente explicitados, foram suplementados com os antibióticos Tetraciclina (12,5µg/ml) ou Canamicina (50µg/ml).

Meio de Cultura	Componentes	Quantidades
LB Broth	NaCl	10g
	Triptona	10g
	Extrato de levedura	5g
	Água deionizada qsp	1L
	Observação:	Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5N e autoclavar.
LB-Agar	NaCl	10g
	Triptona	10g
	Extrato de levedura	5g
	Agar	20g
	Água deionizada qsp	1L
Observação:	Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5N, autoclavar, resfriar até aproximadamente 50°C e deixar solidificar.	
LB Top Agar	Agarose	0,7% (p/v)
	LB Broth qsp	1L
	Observação:	Autoclavar, resfriar até aproximadamente 50°C e deixar solidificar em placas de petri.
NZY Agar	NaCl	5g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2g
	Extrato de levedura	5g
	NZ Amina (Hidrolisado de Caseína)	10g
	Agar	15g
	Água deionizada qsp	1L
	Observação:	Ajustar o pH para 7,5 com NaOH 5N, autoclavar, resfriar até aproximadamente 50°C e deixar solidificar.
NZY Broth	NaCl	5g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2g
	Extrato de levedura	5g
	NZ Amina (Hidrolisado de Caseína)	10g
	Água deionizada qsp	1L
	Observação:	Ajustar o pH para 7,5 com NaOH 5N e autoclavar.
NZY Top Agar	Agarose	0,7% (p/v)
	NZY Broth qsp	1L
Super Broth	Triptona	35g
	Extrato de levedura	20g
	NaCl	5g
	Água deionizada qsp	1L
	Observação:	Ajustar o pH para 7,5 com NaOH 5N e autoclavar.
2x YT Broth	NaCl	10g
	Extrato de levedura	10g
	Triptona	16g
	Água deionizada qsp	1L
Observação:	Ajustar o pH para 7,5 com NaOH 5N e autoclavar.	

9.3. GÉIS

Gel	Componente	Quantidade
Gel de Agarose	TBE	3ml
	Água deionizada	27ml
	Agarose	0,3g
	Brometo de Etídeo (10mg/ml)	1 μ l
	Observação:	Fundir os componentes acima e deixar resfriar até aproximadamente 50°C para a adição do Brometo de Etídeo.
Gel de Agarose desnaturante	MOPS 10X	10ml
	Água c/ DEPC (0,1%)	85ml
	Agarose	1g
	Formaldeído 37%	5,4ml
	Observação:	Fundir os componentes acima e deixar resfriar até aproximadamente 50°C para a adição do formaldeído.
Gel de Poliacrilamida 15% (5 géis – Hoefer)	Tris-HCl 2.0M pH 8.8	11,25ml
	SDS 10%	300 μ l
	Bis-Acrilamida (0,8%,30%)	15ml
	Água Mili-q	8,95ml
	Temed	37,5 μ l
Gel de corrida	Persulfato de Amônio	184 μ l
	Observação:	Observar a polimerização do gel no becker para dar procedimento.
Gel de empilhamento	Tris-HCl 1.25M pH 6.8	432 μ l
	SDS 10%	45 μ l
	Bis-Acrilamida (0,8%,30%)	675 μ l
	Água Mili-q	3,3ml
	Temed	11,25 μ l
	Persulfato de Amônio	33,75 μ l
Observação:	Observar a polimerização do gel no becker para dar guardar ou utilizar os géis.	
Tampão do Gel de Tricina	Tris	36,34g
	SDS	0,3g
	Água Miliq qsp	100ml
	Observação:	Ajustar o pH para 8,45 com HCl
Tampão de Corrida do Gel de Tricina	Tris	6,055g
	Tricina	8,96g
	SDS	0,5g
	Água Miliq qsp	500ml
	Observação:	Ajustar o pH para 8,25 com HCl

9.4. SOLUÇÕES

Solução	Componente	Quantidade
TAE 10X	Tris-acetato	400mM
	EDTA	10mM
TBE 10X	Tris base	108g
	Ácido Bórico	54g
	EDTA	3,72g
	Água deionizada	800ml
	Observação:	Acertar o pH para 8 com HCl.
	Água deionizada qsp	1L
MOPS 10X	MOPS	200mM
	Acetato de sódio	50mM
	Observação:	Ajustar o pH entre 6,5 e 7,0 com NaOH 5N. Não autoclavar.
Ligase 10X	Tris-HCl (pH 7,5)	500mM
	MgCl ₂	70mM
	DTT	10mM
SM	NaCl	5,8g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2g
	Tris-HCl 1M (pH 7,5)	50ml
	Gelatina 2% (p/v)	5ml
	Água deionizada qsp	1L
SSC 20X	NaCl	175,3g
	Citrato de Sódio	88,2g
	Água deionizada	800ml
	Observação	Ajustar o pH em para 7 com NaOH 10N.
	Água deionizada qsp	1L
STE 10X	NaCl	1M
	Tris-HCl (PH 7,5)	200mM
	EDTA	100mM
Amostra de RNA	MOPS 10X	160µl
	Formamida	720µl
	Formaldeído 37%	260µl
	Água (c/DEPC 0,1%)	100µl
	Glicerol estéril	80µl
	Azul de Bromofenol Saturado (BPB)	80µl
	Brometo de Etídio (10mg/ml)	100µl

9.5. ARQUIVOS DISPONÍVEIS EM DISCO COMPACTO (CD)

/	Diretório raiz
aVb3-ECH	Complexo integrina α V β 3-echistatina
Desintegrinas	Desintegrinas com estruturas resolvidas mencionadas no trabalho
Integrinas	Integrina aVb3 e sua forma complexada ao peptídeo RGD
Metaloproteases	Metaloproteases com estrutura resolvida mencionadas no trabalho
Qualidade	Resultados de avaliações de qualidade de estruturas
1FVL	Avaliações de qualidade da flavoridina (usada como molde)
Procheck	Resultados do programa PROCHECK
Verify3D	Resultados do programa VERIFY 3D
What If	Resultados do programa WHATCHECK (WHATIF)
1J2L	Avaliações de qualidade da trimestatina (usada como molde)
Procheck	Resultados do programa PROCHECK
Verify3D	Resultados do programa VERIFY 3D
What If	Resultados do programa WHATCHECK (WHATIF)
aVb3-DisBa-01	Avaliações de qualidade do complexo α V β 3-DisBa-01 (modelada nesse trabalho)
Procheck	Resultados do programa PROCHECK
Verify 3D	Resultados do programa VERIFY 3D
Whatif	Resultados do programa WHATCHECK (WHATIF)
DisBa-01	Avaliações de qualidade da DisBa-01 livre (modelada nesse trabalho)
Procheck	Resultados do programa PROCHECK
Verify3D	Resultados do programa VERIFY 3D
What If	Resultados do programa WHATCHECK (WHATIF)
ECH-aVb3	Avaliações de qualidade da α V β 3-echistatina (usada como molde)
Procheck	Resultados do programa PROCHECK
Verify 3D	Resultados do programa VERIFY 3D
Whatif	Resultados do programa WHATCHECK (WHATIF)
Tese	Modelos obtidos nesse trabalho