

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

OBTENÇÃO DE UMA DESINTEGRINA RECOMBINANTE DE *Agkistrodon
contortrix laticinctus* E ESTUDO DOS EFEITOS DE DESINTEGRINAS NA
EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE ENDOTÉLIO
VASCULAR

Juliana Uema Ribeiro

SÃO CARLOS – SP
2005

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

OBTENÇÃO DE UMA DESINTEGRINA RECOMBINANTE DE *Agkistrodon
contortrix laticinctus* E ESTUDO DOS EFEITOS DE DESINTEGRINAS NA
EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE ENDOTÉLIO
VASCULAR

Juliana Uema Ribeiro

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP
2005

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

R484od

Ribeiro, Juliana Uema.

Obtenção de uma desintegrina recombinante de *Agkistrodon contortrix laticinctus* e estudo dos efeitos de desintegrinas na expressão do fator de crescimento de endotélio vascular / Juliana Uema Ribeiro. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

99 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Biologia molecular. 2. Proteína recombinante. 3. Proteínas - purificação. 4. Desintegrina. 5. VEGF. I. Título.

CDD: 574.8 (20^a)

Orientadora

Profª. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

Dedico este trabalho aos meus pais,
José e Reiko, e à minha irmã, Renata

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, por sua orientação, confiança e paciência. Sua competência serve de exemplo e estímulo para que eu continue a caminhada.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório: Adilson, Carmen, Carol, Márcia, Mônica, Oscar, Raquel, Rita, Verzola, Bete e Ademar, pelas contribuições no trabalho e pelos momentos divertidos.

Agradeço, em especial, às amigas Ana Flávia e Cristina, que começaram apenas como colegas e hoje fazem parte da minha seleção especial de amigos.

Agradeço aos professores que contribuíram para a realização do trabalho, em especial a Dra. Dulce H. F. de Souza (USP – São Carlos) pelas dicas para os experimentos de clivagem, entre outras coisas.

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Rose, Tati e Regiane, por resolver todos os pequenos grandes problemas!

Agradeço aos meus pais, José e Reiko, e à minha irmã, Renata, pelo apoio desde o início, muito antes de vir para São Carlos... Também agradeço minhas avós e meus avôs (*in memorian*), tios e primos, pela confiança enorme e orgulho. Espero poder corresponder à expectativa de todos!

Agradeço também ao meu namorado, Thiago, por sua paciência, amor e compreensão, importantes para me ajudar a superar mais esta fase.

A todos os meus amigos, em especial a Sabrina e ao Marc, pela força desde a seleção para o mestrado.

Agradeço, enfim, a todos que me auxiliaram a concluir este trabalho. Obrigada!

“Foi o tempo que perdeste com a tua rosa que fez tua rosa tão importante.
Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”

Antoine De Saint-Exupéry

RESUMO

As desintegrinas são proteínas de veneno de serpente usadas no estudo de processos biológicos envolvendo a adesão celular mediada por integrinas. A produção de desintegrinas recombinantes é de grande importância para tais estudos, pois podem ser obtidas de forma mais rápida, com maior rendimento e qualidade mais constante quando comparada com a obtenção a partir de veneno bruto. Esta dissertação descreve a otimização da expressão da ACLD-C recombinante. ACLD-C é uma proteína tipo desintegrina da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*, que possui um domínio desintegrina-like com um motivo DCD e um domínio rico em cisteína. Esta proteína foi subclonada a partir do clone da ACLD (GenBank U86634), uma metalopeptidase. Um protocolo de expressão foi estabelecido em nosso laboratório, onde ACLD-C recombinante é produzida em *E. coli*, utilizando-se o vetor de expressão pMal-p. Este vetor possibilita a expressão da proteína-alvo na forma de fusão N-terminal com a proteína MBP (*maltose-binding protein*), a qual facilita a purificação, o enovelamento correto e a produção da desintegrina na forma solúvel. De fato, MBP/ACLD-C foi expressa na forma solúvel e purificada em duas etapas: cromatografia de afinidade em resina de amilose e cromatografia de gel-filtração em resina superdex-200. Modificações no protocolo de expressão permitiram a otimização da expressão da MBP/ACLD-C de 0,4mg/L de cultura para 1,2mg/L de cultura. O rendimento final da MBP/ACLD-C foi de 1,2mg/L de cultura (12,6% do total de proteínas no espaço periplásmico de *E. coli*). MBP/ACLD-C imobilizada em resina de amilose foi submetida à reação de clivagem com a enzima fator Xa para separar ACLD-C da MBP. A separação foi confirmada através da reação positiva ao anticorpo anti-ALT-C, uma desintegrina-like de *Bothrops alternatus*. Estudos com ALT-C mostraram que ela foi capaz de induzir a expressão de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) em fibroblastos humanos e induzir a proliferação de células endoteliais e a angiogênese. Assim, resolveu-se investigar se MBP/ACLD-C também é capaz de induzir a expressão deste fator de crescimento nestas células, o que constitui a segunda parte deste trabalho. MBP/ACLD-C e outras duas desintegrinas, echistatina, uma desintegrina-RGD, e EC6, uma desintegrina heterodimérica, foram incubadas com os fibroblastos para verificar a influência dessas proteínas na expressão de VEGF através de ensaios de ELISA. MBP/ACLD-C foi capaz de induzir fortemente a expressão de VEGF até 4h, quando o nível da citocina decresceu até 24 e novamente aumentou até 48h. EC6 também foi capaz de induzir a expressão do fator de crescimento até 4h, quando o nível também decresceu até 24h. O experimento no período de 24h-48h não foi realizado devido a problemas de contaminação. Echistatina, por sua vez, não apresentou indução de VEGF em relação ao controle, e as células incubadas com essa desintegrina desaderiram do plástico, o que não ocorreu com as outras duas proteínas.

ABSTRACT

Disintegrins are snake venom proteins used in the study of integrin-mediated cellular adhesion through integrins. Recombinant disintegrin production may notably supply faster, larger and most homogeneous protein samples than brute venom processing. This work describes optimization of the recombinant ACLD-C expression technique. ACLD-C is a disintegrin-like protein from *Agkistrodon contortrix laticinctus*, that have a disintegrin-like domain with DCD motif, and a cysteine-rich domain. This protein was subcloned from the ACLD clone (GenBank U86634), a metallopeptidase. A protocol of expression was established in our laboratory, where recombinant ACLD-C is produced in *E. coli*, using the expression vector pMal-p. This allows protein target expression in form of N-terminal fusion with MBP (maltose-binding protein), that facilitate purification, correct folding and production of disintegrin in soluble form. In fact, MBP/ACLD-C was expressed in soluble form and purified in two stages: affinity chromatography in amilose resin and chromatography of gel-filtration in superdex-200 resin. Modifications in expression protocol optimized MBP/ACLD-C expression in culture of 0,4 mg/L of culture of 1,2 mg/L (12,6% total of protein in periplasmic space of *E. coli*). MBP/ACLD-C immobilized in amilose resin was subjected to digestion with enzyme factor Xa to separate ACLD-C of MBP. The separation was confirmed through positive reaction with anti-ALT-C antibody. ALT-C is a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus*. ALT-C induced both expression of VEGF in human fibroblasts and proliferation of endothelial cells and angiogenesis. In second part of this work, we investigated if MBP/ACLD-C was also able to induce the expression of this growth factor in this cells. MBP/ACLD-C and two other disintegrins, echistatina, a disintegrin-RGD, and EC6, a heterodimeric disintegrin, were incubated with fibroblasts. The influence of these proteins in VEGF expression was evaluated by ELISA. MBP/ACLD-C was able to strongly induce the expression of VEGF until 4 hours, when the level decreased until 24 hours. Experiment in period of 24 – 48 hours was not done due to problems of contaminations. Echistatin did not induced VEGF expression, but induced fibroblasts detachment from plastic. The latter event was not observed in MBP/ACLD-C or EC6 incubated cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Famílias de zinco-metalopeptidases.....	17
Figura 2 – Diagrama esquemático da estrutura das classes de metalopeptidases de venenos de serpentes.....	22
Figura 3 – Representação esquemática dos domínios estruturais das ADAMs e SVMPS.....	23
Figura 4 – Esquema das subunidades que compõem uma integrina.....	29
Figura 5 – Esquema das diferentes associações entre as subunidades α e β e divisão dos heterodímeros em subgrupos	29
Figura 6 – Principais eventos de sinalização celular desencadeados pela ligação das integrinas a ligantes na ECM.....	35
Figura 7 – Sinalização desencadeada por VEGF.....	38
Figura 8 – Seqüência de aminoácidos/nucleotídeos da desintegrina- <i>like</i> ACLD-C.....	42
Figura 9 – Vetores de expressão pMal-2.....	46
Figura 10 – Ensaio de expressão de MBP/ACLD-C.....	53
Figura 11 – Ensaio de expressão utilizando coquetel inibidor de peptidases.....	54
Figura 12 – Cromatografia de afinidade.....	55
Figura 13 – Análise em SDS-PAGE 15% das frações obtidas em cromatografia de afinidade em resina de amilose a partir da aplicação de Sf.....	55
Figura 14 – Cromatografia de gel-filtração.....	56
Figura 15 – Análise em SDS-PAGE 15% das frações obtidas em cromatografia de gel-filtração a partir da aplicação das frações eluídas no segundo pico da cromatografia de afinidade.....	57
Figura 16 – Ensaio de clivagem da MBP/ACLD-C com fator Xa a temperatura ambiente.....	58
Figura 17 – Nível de expressão de VEGF em fibroblastos incubados com MBP/ACLD-C, echistatina e EC6 solúveis.....	69
Figura 18 – Imagens de fibroblastos humanos tratados com MBP/ACLD-C após 24h.....	70
Figura 19 – Imagens de fibroblastos humanos tratados com MBP/ACLD-C após 48h.....	71
Figura 20 – Imagens de fibroblastos humanos tratados com echistatina após 48h.....	73
Figura 21 – Imagens de fibroblastos humanos tratados com EC6 após 24h	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ligantes de integrinas e suas distribuições celulares.....	30
Tabela 2 – Proteínas ligantes das subunidades α e β das integrinas.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACLD:** metalo/desintegrina da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*.
- ACLD-C:** desintegrina-like com o domínio rico em cisteína da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*.
- ADAM:** proteína multimodular com os domínios metalopeptidase e desintegrina-like.
- ADAMT:** ADAM com domínio adicional que contém repetições do tipo ! encontrado nas trombospondinas.
- ALT-C:** Alternagina-C.
- CAM:** molécula de adesão celular.
- DMEM:** meio Dulbecco's modificado.
- D/ECD:** seqüência adesiva formada por ácido aspártico/ácido glutâmico – cisteína – ácido aspártico.
- ECM:** matriz extracelular.
- EGF:** fator de crescimento epitelial.
- FAK:** quinase de adesão focal.
- FGF:** fator de crescimento de fibroblastos.
- HUVEC:** células endoteliais de veia de cordão umbilical humano.
- ICAM:** molécula de adesão intracelular.
- KGD:** lisina – glicina – ácido aspártico.
- MadCAM:** molécula de adesão celular a adressina mucosa.
- MAPK:** proteína quinase ativadora de mitose.
- MBP:** *maltose binding protein*.
- PBS:** tampão salina fosfato.
- PDGF:** fator de crescimento derivado de plaqueta.
- RGD:** seqüência adesiva formada por arginina – glicina – ácido aspártico.
- SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio).
- ShC:** proteína tirosina fosforilada pela FAK.
- SVMP:** metalopeptidases de venenos de serpentes.
- VCAM:** molécula de adesão celular vascular.
- VEGF:** fator de crescimento de endotélio vascular.
- VEGFR:** receptor de fator de crescimento de endotélio vascular.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
COMPOSIÇÃO DOS VENENOS DE SERPENTES.....	14
METALOPTIDASES.....	15
Classificação das zinco-metaloptidases.....	16
MMPs.....	17
ADAMs.....	18
SVMPs.....	19
Classificação das SVMPs.....	20
DESINTEGRINAS.....	22
DESINTEGRINAS E METÁSTASE.....	25
ADESÃO CELULAR E INTEGRINAS.....	27
Integrinas e sinalização.....	33
Sinalização <i>outside-in</i>	33
Sinalização <i>inside-out</i>	36
Integrinas e fatores de crescimento.....	37
VEGF.....	37
VEGF e integrinas.....	39
ESTUDO DOS VENENOS DE SERPENTES.....	39
ACLD-C.....	41
OBJETIVOS.....	43
CAPÍTULO 1.....	45
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
MATERIAIS.....	45
Resinas Cromatográficas.....	46
<i>Western blotting</i>	46
Padrões Moleculares de Proteína.....	47
Diálise.....	47
Concentração protéica.....	47
Quantificação protéica.....	47
Clivagem com o Fator Xa.....	48
MÉTODOS.....	48
Ensaio de expressão.....	48

Eletofórese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE.....	49
Purificação da ACLD-C/MBP.....	48
Cromatografia de Afinidade.....	50
Cromatografia de Gel-Filtração.....	50
Ensaio de imunodeteção.....	50
Dosagem de proteínas.....	51
Clivagem com o fator Xa.....	51
Documentação de Imagens.....	52
RESULTADOS.....	53
Ensaio de Expressão.....	53
Purificação do produto de fusão MBP/ACLD-C.....	55
Cromatografia de afinidade.....	55
Cromatografia de gel-filtração.....	56
Ensaio de clivagem com fator Xa.....	57
DISCUSSÃO.....	59
CAPÍTULO 2.....	66
MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
MATERIAIS.....	66
Proteínas.....	66
Linhagens celulares.....	67
Cultura Celular.....	67
Kit VEGF.....	67
Documentação de Imagens.....	67
MÉTODOS.....	67
Manutenção das linhagens celulares.....	67
Ensaio de expressão de VEGF através de ELISA.....	68
Análise estatística.....	68
RESULTADOS.....	69
MBP/ACLD-C.....	69
Echistatina.....	72
EC6.....	72
DISCUSSÃO.....	75
CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

INTRODUÇÃO

A serpente sempre esteve envolvida com os homens, desde o começo dos tempos, e até hoje desperta neles acentuado interesse. Há tempos ela é cultuada por vários povos, representando tanto o bem como o mal. De forma geral, a serpente é símbolo de força e poder, representando o mistério, o imortal, o inconsciente.

As primeiras serpentes surgiram entre 100-150 milhões de anos, no período Cretáceo Inferior. Atualmente são reconhecidas cerca de 3.200 espécies sobrevivendo em diversos habitats, sendo encontradas em quase todas as partes do planeta (HIDER *et al.*, 1991). As mais de 200 espécies venenosas já identificadas são classificadas em quatro famílias principais: (1) Hydrophidae, (2) Elapidae, (3) Viperidae e (4) Crotalidae (MATSUI *et al.*, 2000). No Brasil, há aproximadamente 260 espécies catalogadas de serpentes, das quais cerca de 40 são venenosas.

Os componentes do veneno parecem ser bastante comuns e similares uns aos outros dentro da mesma família de serpentes. Toxinas neurotóxicas são geralmente encontradas nos venenos de Hydrophidae e Elapidae, causando morte por bloqueio da transmissão neuromuscular. Já as serpentes das outras duas famílias, Viperidae e Crotalidae, causam choque, coagulação intravascular, hemorragia local e sistêmica, edema e necrose tecidual, devido à ação de toxinas hemorrágicas e mionecróticas (BJARNASON & FOX, 1994).

Entretanto, apesar de compartilhar efeitos gerais dentro de uma mesma família de serpentes, os venenos apresentam diferenças de composição dependendo de cada espécie (Tu, 1996; Ouyang *et al.*, 1990). Existem vários componentes únicos, isolados do veneno de apenas uma espécie. Além disso, Daltry *et al.*, (1996) demonstraram que os componentes de veneno apresentam uma variação geográfica considerável mesmo dentro de cada espécie de serpente devido a sua dieta, concordando com a observação prévia que os componentes da mesma espécie podem ser diferentes dependendo do lote do veneno.

COMPOSIÇÃO DOS VENENOS DE SERPENTES

Glândulas exócrinas constituem o aparato produtor do veneno das serpentes, produzindo uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos que compõe os venenos. Os constituintes inorgânicos dos venenos incluem cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (FRIEDERICH & TU, 1971). A presença e quantidade destes metais nos venenos variam de acordo com a espécie estudada.

Acredita-se que a função de alguns destes componentes, tais como cálcio, magnésio e manganês, seja contribuir para a estabilização de certas proteínas do veneno, enquanto outros, como zinco, cobre, ferro e cobalto, participam de mecanismos catalíticos de determinados componentes enzimáticos presentes no veneno, tais como as metalopeptidases (BJARNASON & FOX, 1994).

A maior parte dos venenos, porém, é composta por proteínas e peptídeos com variadas atividades biológicas, compreendendo cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno (MARKLAND, 1998). Estes componentes protéicos/peptídicos com diferentes estruturas e funções são secretados pelas glândulas veneníferas, tanto na forma ativa quanto na forma precursora inativa, no local da picada. As formas precursoras dos componentes são ativadas por um mecanismo especial após a secreção.

Outros componentes incluem carboidratos (em glicoproteínas), nucleosídeos, aminas biogênicas e níveis muito baixos de aminoácidos livres e lipídeos (RUSSEL, 1980; TU, 1988a).

Os venenos de serpentes contêm muitas atividades enzimáticas variadas, desempenhadas por fosfolipases, fosfodiesterases, fosfomonoesterases, L-aminoácido oxidase, acetilcolinesterase, peptidases (proteases), hialuronidases, ADPases, entre outras (RUSSEL, 1980; TU, 1988a; MEYER, 1990; STOCKER, 1990a). Nem todas estas enzimas estão presentes em todos os venenos. Entre os peptídeos encontrados nos venenos estão as neurotoxinas pré e pós-sinápticas, neurotoxinas de ligação ao canal de potássio, citotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas e desintegrinas (RUSSEL, 1980; TU, 1988a,b; STOCKER, 1990a; NIEWIAROWSKI *et al.*, 1994).

METALOPEPTIDASES

As peptidases estão presentes na maioria dos venenos, exceto em Hydrophidae, e por isso têm sido estudadas por muitos investigadores desde o início do século passado, quando a coagulação sangüínea causada por um veneno de serpente foi primeiro reconhecida, embora a primeira protease com atividade coagulante tenha sido purificada por volta de 1950. Desde então, mais de 150 proteases diferentes foram completa ou parcialmente purificadas e funcionalmente caracterizadas (MARKLAND, 1991; MARKLAND, 1998; PIRKLE & THEODOR, 1990; PIRKLE, 1998; PIRKLE & STOCKER, 1991).

As proteases isoladas até o momento são geralmente classificadas funcionalmente em (1) serinopeptidases e (2) metalopeptidases (SVMPs – *Snake Venoms*

Metallopeptidases). Entre os efeitos desencadeados por estas proteases estão as atividades pró-coagulante (SELISTRE E GIGLIO, 1987), hemorrágica (BJARNASON & TU, 1978; SELISTRE *et al.*, 1990a; JOHNSON & OWNBY, 1997), anticoagulante (SELISTRE *et al.*, 1990b; CHEN & RAEL, 1997), fibrinolítica (GUAN *et al.*, 1991), ativadora de plaquetas (SERRANO *et al.*, 1995) e inibidora de agregação plaquetária (KINI & EVANS, 1991; FUJIMURA *et al.*, 1995).

Metalopeptidases (MPs) são hidrolases do tipo endopeptidases que dependem da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico para exercer suas atividades. Entre as diversas funções fisiológicas destas enzimas incluem-se angiogênese, fertilização, fusão de mioblastos, enovelamento protéico e remodelamento tecidual (BORKAKOTI, 1998; SCHMIDT, LUPAS & FINLEY, 1999). Algumas MPs possuem papel na sinalização intracelular durante o desenvolvimento neuronal (WEN, METZSTEIN & GREENWALD, 1997; TANG, 2001).

Classificação das zinco-metalopeptidases

As zinco-metalopeptidases podem ser classificadas em 4 grupos, baseados em similaridades nas seqüências de aminoácidos e na estrutura primária de seus sítios catalíticos (HOOPER, 1994) (Figura 1): 1) Zincinas (seqüência HEXXH como motivo de ligação ao zinco); 2) Inverzincinas (motivo invertido HXXEH de ligação ao zinco); 3) Carboxipeptidases (motivo HXXE de ligação ao zinco) e 4) DD-carboxipeptidases (motivo HXH de ligação ao zinco).

As zincinas constituem o maior grupo, sendo subdivididas em gluzincinas (aquelas em que o terceiro ligante do zinco é um Glu) ou Metzincinas (onde o terceiro ligante é uma His).

As metzincinas incluem quatro subgrupos: (1) astacinas (presentes em crustáceos), com resíduo de Glu após o terceiro ligante do zinco; (2) serralisinas (bacterianas), onde o resíduo de Glu é substituído por uma Pro; (3) matrixinas (MMPs em mamíferos), com um resíduo de Ser ou Thr após o terceiro ligante do metal; e (4) reprotisinas (ADAMs, *A Disintegrin And Metallopeptidases*, e ADAMTS, *ADAM with Thrombospondin motifs*, em mamíferos, e SVMPS, *Snake Venom Metallopeptidases*, em serpentes), que possuem um resíduo de Asp após o terceiro ligante de zinco (HOOPER, 1994).

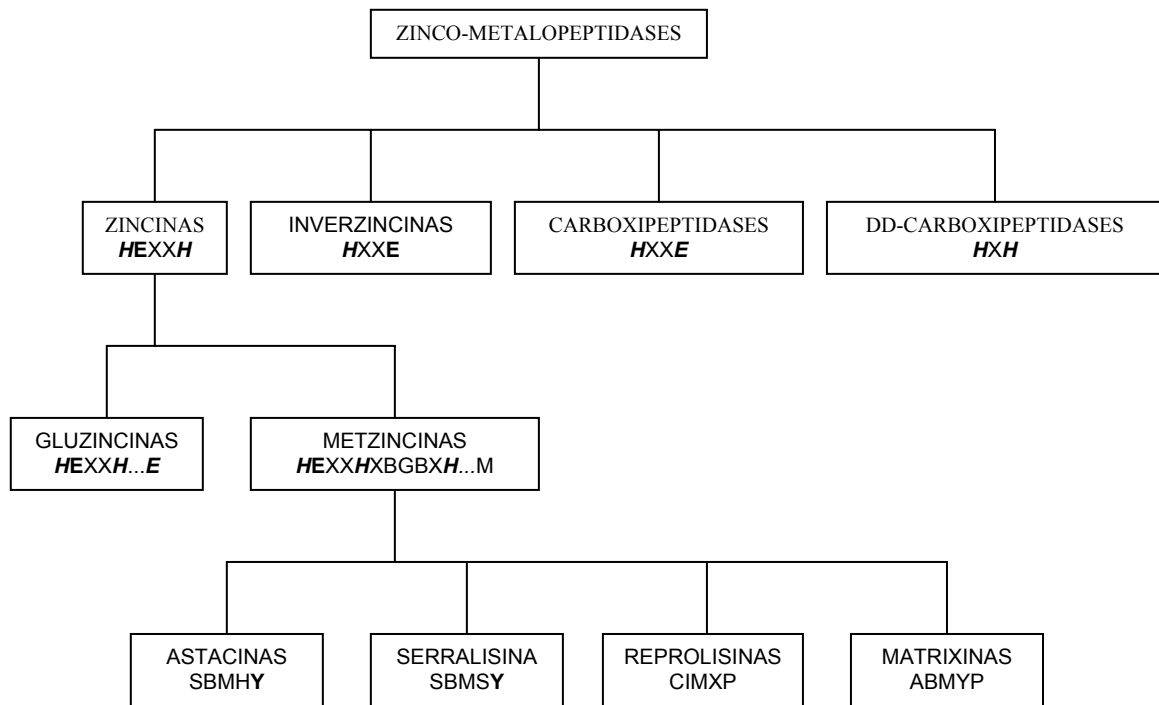


Figura 1 - Famílias de zinco-metalopeptidases. B: resíduos apolares; X: resíduos quaisquer; Itálico: resíduos ligados ao zinco; Negrito: resíduos envolvidos na catálise enzimática. Extraído e modificado de HOOPER *et al.*, 1994.

MMPs

As matrixinas ou MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) constituem uma família de ampla distribuição, com pelo menos 20 endopeptidases humanas, com novas enzimas ainda sendo descobertas (LLANO *et al.*, 1999; VELASACO *et al.*, 1999). Estas metalopeptidases são caracterizadas pelos seus domínios pró-enzima, domínio ativo e domínio de ligação ao zinco altamente conservados (NAGASE *et al.*, 1993; BODE *et al.*, 1999).

A maioria das MMPs é secretada na forma de pró-enzima solúvel no meio extracelular, onde são ativadas por clivagem proteolítica de um domínio amino-terminal (STETLER-STEVENSON *et al.*, 1993; RAY *et al.*, 1994; BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993). Entretanto, várias MMPs podem se localizar preferencialmente na superfície celular, MT-MMP (*membrane type-MMPs*), tanto pela presença de um domínio transmembrana quanto através da interação com um ligante tipo-receptor, como a integrina $\alpha\beta_3$ expressa na superfície das células (BROOKS *et al.*, 1996). A presença destas proteínas de ligação a MMPs permite que células tumorais concentrem e ativem essas peptidases.

As MMPs são as principais peptidases degradantes da matriz extracelular (ECM), participando de muitos processos biológicos, tais como desenvolvimento embrionário, morfogênese de órgãos, implantação do blastocisto, ovulação, dilatação cervical, involução uterina pós-parto, ciclo endometrial, remodelamento ósseo e cicatrização (PARKS & MECHAM, 1998).

A expressão da maioria das matrixinas é transcricionalmente regulada por fatores de crescimento, hormônios, citocinas, interações célula-célula-ECM e célula-célula, e transformação celular. As atividades enzimáticas são controladas por uma combinação de ativação do zimogênio (pró-MMP) e inibição por inibidores endógenos, como a α_2 -macroglobulina, e inibidores teciduais de metalopeptidases (TIMPs) (CUZNER & OPDENAKKER, 1999). As TIMPs, por sua vez, também têm sua expressão controlada durante o remodelamento tecidual e condições fisiológicas para manter um equilíbrio no metabolismo da ECM (GOMEZ *et al.*, 1997; DAS *et al.*, 1997). O rompimento deste equilíbrio pode resultar em doenças associadas com reposição descontrolada da matriz, tais como artrite, doenças cardiovasculares, nefrite, desordens neurológicas, ulceração tecidual, fibrose e câncer (NAGASE, 1996; WOESSNER, 1998).

A superexpressão de MMPs é característica da maioria dos tumores malignos, e, no caso de alguns carcinomas, a presença de MMPs específicas tem se mostrado como significativo prognóstico (MURRAY *et al.*, 1998; AHMAD *et al.*, 1998; TALVENSAARI-MATTILA *et al.*, 1998; REE *et al.*, 1997; FONG *et al.* 1996).

ADAMs

As ADAMs (*A Disintegrin And Metallopeptidases*) são proteases cuja estrutura é constituída por uma seqüência sinal (secreção), um pró-domínio (processado após a ativação da proteína) e os domínios metalopeptidase, desintegrina-*like*, rico em cisteína, EGF-*like*, transmembrana e citoplasmático (WOLFSBERG & WHITE, 1996; WOLFSBERGH *et al.*, 1995; BLOBEL, 1997). O domínio desintegrina-*like* das ADAMs media interações célula-célula via moléculas de integrina, uma etapa crucial em diversos processos fisiológicos, tais como a fertilização. O domínio citoplasmático possui potenciais sítios de fosforilação, sugerindo um papel na transdução de sinais. Deste modo, com base na sua organização estrutural, acredita-se que estas proteínas são mediadoras de uma variedade de funções celulares, incluindo processamento de formas precursoras e fatores de crescimento, adesão celular, fusão e sinalização (KILLAR *et al.*, 1999).

As primeiras ADAMs a serem descobertas, ADAM 1 e 2, foram relacionadas a processos reprodutivos como a espermatogênese e a fusão óvulo-espermatozóide (WOLFSBERGH & WHITE *et al.* 1996; MYLES E PRIMAKOFF, 1997; CHO *et al.*, 1998).

Até o momento foram identificados os genes de 20 ADAMs e mais de 30 membros protéicos desta família já foram descritos (STONE *et al.*, 1999; PRIMAKOFF & MYLES, 2000). Os genes deste grupo de proteínas são classificados em dois grupos: grupo de metalopeptidases ativas ou potencialmente ativas, as quais possuem a seqüência consenso de ligação do zinco no domínio catalítico; o outro grupo abrange ADAMs cujo domínio metalopetidase é inativo, aparentemente devido à ausência do motivo de ligação ao metal (WOLFSBERGH *et al.*, 1993; HEILEN *et al.*, 1994; EMI *et al.*, 1993).

As ADAMs são encontradas em espécies variadas, tais como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, camundongos e humanos (FAMBOROUGH *et al.*, 1996; ROOKE *et al.*, 1996; BLOBEL, 1997; WOLFSBERGH & WHITE, 1996). A maioria delas são glicoproteínas ancoradas a membrana celular, mas também podem ser encontradas na forma solúvel ou associadas à ECM (STREULI, 1999). Algumas ADAMs-T (ADAM com repetições do tipo-1 da trombospondina) são capazes de clivar componentes da matriz (KUNO *et al.*, 1999).

Estudos sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tumores indicam que as MMPs e as ADAMs desempenham papel importante na disseminação tumoral. As MMPs induzem o crescimento ou a sobrevivência de tumores, a invasão, a angiogênese e as metástases, ao passo que as ADAMs são relacionadas com a sinalização intracelular e adesão celular (STERNLICHT & WERB, 2001). HOURIUCHI *et al* (2003) mostraram que as ADAMs agem como moléculas de adesão celular ligando-se a integrinas através de seu domínio desintegrina-*like*. Esta ligação deslocaria as integrinas do seu ligante na ECM e a célula seria liberada do seu substrato.

SVMPs

Os venenos de serpentes contêm uma variedade de metalopeptidases (SVMPs) tóxicas, potencialmente hemorrágicas, devido à capacidade de digerir diversas proteínas da membrana basal endotelial e da matriz extracelular como: laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas (BARAMOVA *et al.*, 1990). Proteínas envolvidas na coagulação sanguínea como fibrinogênio (IMAI *et al.*, 1989; JOHNSON & OWNBY, 1993) e fator von Willebrand (KAMIGUTI *et al.*, 1996) também são alvos da digestão enzimática, contribuindo

para instalação do quadro hemorrágico. Contudo, SVMPs não hemorrágicas também foram descritas (WILLIS & TU, 1988; DATTA *et al.*, 1995; TERADA *et al.*, 1999).

Análises comparativas da estrutura primária das SVMPs indicam que os efeitos hemorrágicos podem estar associados não apenas a estrutura protéica (TERADA *et al.*, 1999), mas também a modificações pós-traducionais nessas peptidases, como o padrão de glicosilação (HITE *et al.*, 1994).

Embora muitas metalopeptidases sejam α -fibrinogenases (degradam a cadeia α do fibrinogênio) e inibam a agregação plaquetária, é possível que seus domínios catalítico e desintegrina-like degradem ou interajam, respectivamente, com receptores plaquetários (integrinas) essenciais para a agregação.

A maioria das SVMPs, tanto as hemorrágicas como as não hemorrágicas, são enzimas fibrino(geno)líticas (MARKLAND, 1998). As metalopeptidases com tal atividade são aplicáveis a tratamentos médicos para diminuir os níveis de fibrinogênio no plasma ou solubilizar o plasma coagulado (trombose).

Classificação das SVMPs

Mais de 100 metalopeptidases (incluindo isozimas da mesma espécie) foram isoladas, sendo que cerca de 20 tiveram sua seqüência de aminoácidos determinada. Estas peptidases foram purificadas principalmente de venenos crotalídicos e viperídicos, mas recentemente, alguns homólogos foram isolados também de veneno elapídico.

BJARNASON & FOX (1994) classificaram as SVMPs em quatro grupos (PI a PIV), de acordo com a massa molecular e a organização dos domínios (Figura 2). SVMPs da classe PI (20-30kDa), tais como trimerelisina II (*Trimeresurus flavoviridis*) e atrolisina C (*Crotalus atrox*), consistem somente do domínio peptidase com atividade hemorrágica relativamente fraca. As proteínas desta classe são divididas, ainda, em dois subgrupos, que possuem duas ou três pontes dissulfeto (BJARNASON & FOX, 1994; HITE *et al.*, 1994; SELISTRE-DE-ARAUJO & OWNBY, 1995; JIA *et al.*, 1996).

A classe PII inclui metalopeptidases de tamanho médio (30-50kDa), as quais possuem um domínio desintegrina adicionado ao C-terminal do domínio catalítico. Desintegrinas como a trigramina e rodostomina são peptídeos de veneno com aproximadamente 50-60 resíduos contendo a seqüência de aminoácidos RGD que inibe fortemente a agregação plaquetária pela interação com a integrina plaquetária $\alpha_{IIb}\beta_3$.

(GPIIb/IIIa) (McLANE *et al.*, 1998). Foi proposto que estas desintegrinas são geradas pelo processamento proteolítico da proteína precursora SVMP da classe PII.

As SVMPs hemorrágicas de alta massa molecular (50-65 kDa), tais como trimerelisina I (*Trimeresurus flavoviridis*), atrolisina A (*Crotalus atrox*), jararagina (*Bothrops jararaca*) e alternagina (*Bothrops alternatus*), contêm os domínios desintegrin-*like* e rico em cisteína, sendo classificadas como PIII. O domínio desintegrin-*like* contém a seqüência XXCD (geralmente SECD) no lugar de RGD presente nas desintegrinas. Jararagina-C, isolada de *B. jararaca*, possui seqüência idêntica ao domínio desintegrin-*like* da jararagina e inibe a agregação plaquetária colágeno- ou ADP-induzida (USAMI *et al.*, 1994). Recentemente, uma proteína recombinante composta dos domínios desintegrin-*like* e rico em cisteína, Atrolisina A (*C. atrox*) inibiu a agregação plaquetária estimulada por colágeno e ADP de maneira similar às desintegrinas (JIA *et al.*, 1997). Assim como atrolisina A, alternagina-C possui os domínios desintegrin-*like* e rico em cisteína, e também inibe a adesão celular ao colágeno dependente da integrina $\alpha_2\beta_1$ (SOUZA *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que o domínio desintegrin-*like* também interage com moléculas de integrina ou outros receptores. Acredita-se que o domínio rico em cisteína possa participar na estruturação do domínio desintegrin-*like* ou que esteja envolvido em interações com ligantes (JIA *et al.*, 1996), pois domínios ricos em cisteína recombinantes (JIA *et al.*, 2000) e peptídeos sintéticos produzidos a partir da estrutura desses domínios (KAMIGUTI *et al.*, 2003) inibiram de forma eficaz a agregação plaquetária induzida por colágeno. Assim, o maior potencial hemorrágico das SVMPs PIII sugere que os domínios desintegrin-*like* e rico em cisteína podem desempenhar um papel chave na ação dessas enzimas já que afetam a agregação plaquetária.

Finalmente, a classe PIV apresenta um domínio lectina-*like*, ligado por ponte dissulfeto, além dos domínios presentes na classe PIII. (BJARNASON & FOX, 1994; HITE *et al.*, 1994; JIA *et al.*, 1996). RVV-X (TAKEYA *et al.*, 1992) e carinactivase-1, o ativador de protrombina de *Echis carinatus* (YAMADA *et al.*, 1996), são membros desta classe, embora o cDNA completo de nenhum deles tenha sido caracterizado.

As SVMPs são sintetizadas e armazenadas na glândula venenífera como zimogênios ou precursores inativos. O peptídeo sinal destas metalopeptidases possui cerca de 18 aminoácido altamente conservados, os quais servem como seqüência sinal para determinação de sua localização sub celular ou secreção (SHAH *et al.*, 1997). As SVMPs possuem, ainda, uma seqüência conservada PKMCGV na região C-terminal do pró-domínio. O resíduo de cisteína bloqueia o sítio ativo por ligação ao íon zinco e mantendo, assim, a função enzimática inibida ou latente. Após a secreção da glândula, o processamento

proteolítico converte o zimogênio para a enzima ativa por remoção do grupo tiol, mecanismo de ativação tipo “Cys-switch” (HITE *et al.*, 1994; GRAMS *et al.*, 1993; NISHIDA *et al.*, 1995).

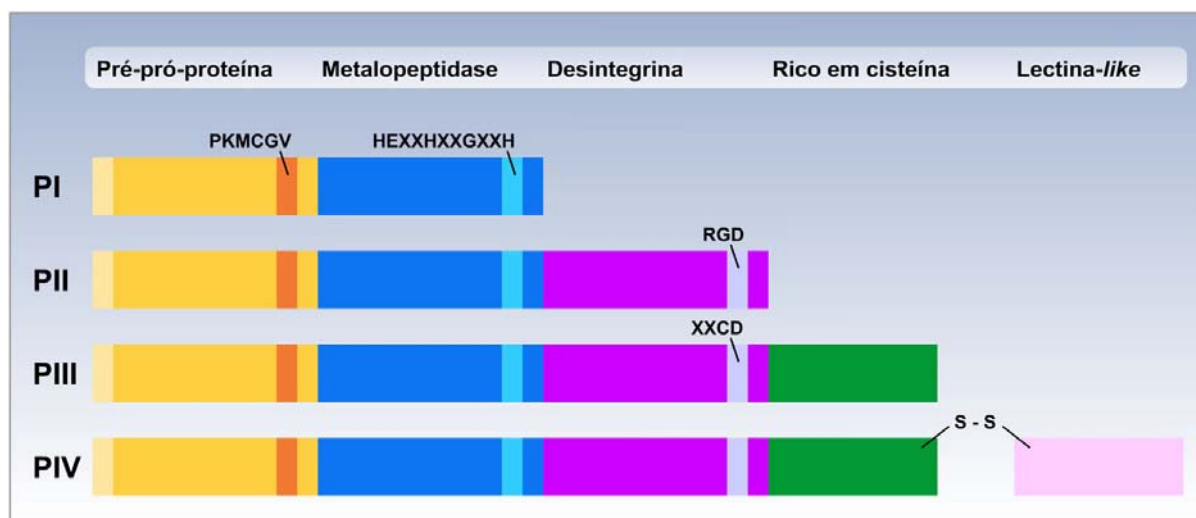


Figura 2 – Diagrama esquemático da estrutura das classes de metalopeptidases de venenos de serpentes. Extraído e modificado de BJARNASON & FOX, 1994.

A seqüência de aminoácidos e a organização estrutural das SVMPs (especialmente aquelas contendo um domínio desintegrina-like) apresentam alta similaridade com as ADAMS, citadas anteriormente (BLOBEL *et al.*, 1992; WESKAMP & BLOBEL, 1994; WOLFSBERGH *et al.*, 1995) (Figura 3). Uma diferença importante entre estas metalopeptidases é que as SVMPs são proteínas secretadas, enquanto que as ADAMS são proteínas transmembrana, apesar de formas solúveis de Adams já terem sido descritas (KATAGIRI *et al.*, 1995; GILPIN *et al.*, 1998; KILLAR *et al.*, 1999; LOECHEL *et al.*, 2000). Outra diferença importante entre elas é que as SVMPs são peptidases ativas, enquanto que cerca da metade das ADAMS não apresentam atividade catalítica devido a alterações nas suas seqüências relacionadas ao zinco (BLACK & WHITE, 1998).

DESINTEGRINAS

Pesquisadores de Taiwan mostraram que os venenos das serpentes *Trimeresurus gramineus* (HUANG & OUYANG, 1984; OUYANG & HUANG, 1983), *Agkistrodon halys* (OUYANG *et al.*, 1983) e *Agkistrodon rhodostoma* (HUANG *et al.*, 1987b) contêm peptídeos que são potentes inibidores de agregação plaquetária. Estudos posteriores resultaram na purificação e seqüenciamento da trigramina, de *Trimeresurus*

gramineus (HUANG *et al.*, 1987b) e echistatina, de *Echis carinatus* (GAN *et al.*, 1988). Ambas as proteínas inibiram fortemente a ligação do fibrinogênio a plaquetas ADP-estimuladas por ligação à glicoproteína IIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$) na superfície plaquetária. GOULD *et al.* (1990) propuseram o termo “desintegrina” para descrever este grupo de pequenas proteínas (5-9kDa) originalmente descritas em venenos de serpentes, ricas em cisteína e que interagem com integrinas, receptores presentes na superfície celular (DENNIS *et al.*, 1989; GOULD *et al.*, 1990; NIEWIAROWSKI *et al.*, 1994; MACLANE *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 1998).

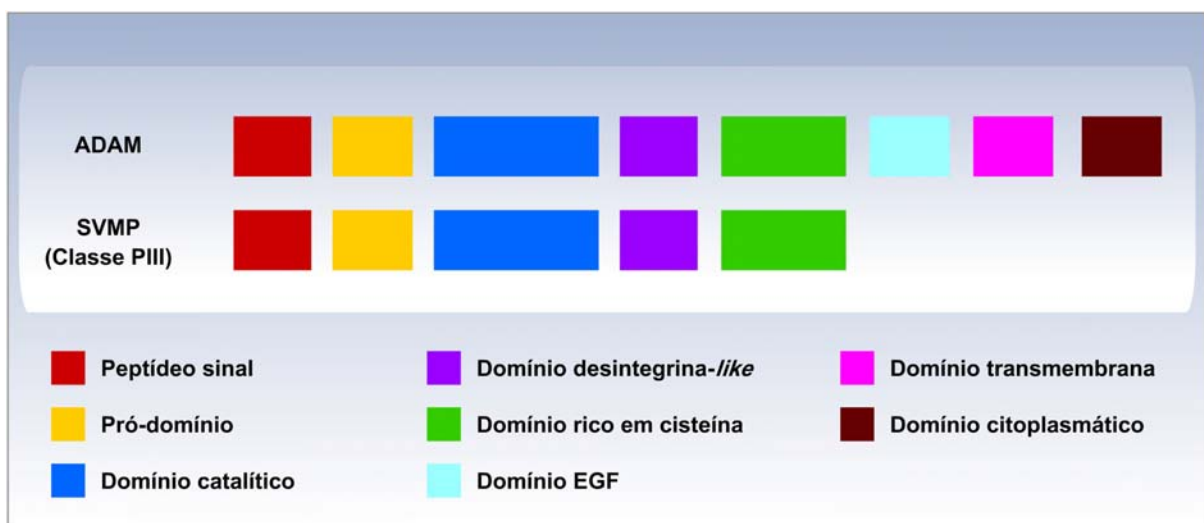


Figura 3 – Representação esquemática dos domínios estruturais das ADAMs e SVMPs. Extraído e modificado de STONE *et al.*, 1999.

HITE *et al.* (1992) identificaram um domínio metalopeptidase e um domínio desintegrina-like na atrolisina, uma toxina hemorrágica de *Crotalus atrox*, e PAINE *et al.* (1992) identificaram os mesmos domínios em jararagina, uma hemorragina de *Bothrops jararaca*. Nenhuma das proteínas contém uma sequência RGD. AU *et al.* (1991; 1993) mostraram que a desintegrina recombinante rhodostomina (kistrina) pode compartilhar um precursor comum com uma provável proteína hemorrágica e sugeriram que o inibidor da agregação plaquetária e a proteína hemorrágica podem compartilhar uma sequência gênica comum. Os resíduos amino-terminais da jararagina, por exemplo, são precedidos por 150 aminoácidos de uma sequência pré-pró-proteína com uma homologia impressionante a sequência encontrada nos genes codificantes da trigramina (NEEPER & JACOBSON, 1990) e rhodostomina (AU *et al.*, 1991; AU *et al.*, 1993). KINI & EVANS (1992) sugeriram que esses dados suportam a existência de precursores das desintegrinas, com as desintegrinas “maduras” resultando de modificação pós-traducional, incluindo proteólise.

As desintegrinas podem ser divididas em cinco grupos diferentes baseando-se em suas características estruturais, como tamanho do polipeptídeo e número de pontes dissulfeto (McLANE *et al.*, 1998; TRIKHA *et al.*, 1994; MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999a; MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999b). O primeiro grupo inclui desintegrinas pequenas, formadas por 49-51 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto, e inclui a echistatina, a eristocophina, a eristostatina e a ocellatusina (CALVETE *et al.*, 1992; BAUER *et al.*, 1993; McLANE *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 2002). Desintegrinas de tamanho médio, com cerca de 70 aminoácidos e seis pontes dissulfeto compõem o segundo grupo (ADLER *et al.*, 1991; CALVETE *et al.*, 1992; CALVETE *et al.*, 1991; BAUER *et al.*, 1993; KLAUS *et al.*, 1993). A grande maioria das 50 ou mais diferentes desintegrinas caracterizadas atualmente pertence a este grupo, cujos membros possuem a seqüência adesiva RGD (desintegrinas-RGD). Exemplos destas desintegrinas são a trigramina, a kistrina, a flavoridina, a albolabrina e a barbourina. O terceiro grupo inclui as desintegrinas de maior tamanho, como a bitistatina, composta de 84 resíduos e sete pontes dissulfeto (CALVETE *et al.*, 1997) e a salmosina (PARK *et al.*, 1998). Um quarto grupo é formado pelas desintegrinas-like, derivadas da classe PIII das SVMPs, formadas por cerca de 100 aminoácidos com 16 resíduos de cisteína envolvidos na formação de oito pontes dissulfeto (MARKLAND, 1998; KINI & EVANS, 1992; JIA *et al.*, 1996; McLANE *et al.*, 1998; CALVETE *et al.*, 2000). Pertencem a este grupo a jararagina-C, a catrocolastatina-C e a alternagina-C, entre outras (USAMI *et al.*, 1994; SHIMOKAWA *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2000). Finalmente, o quinto grupo é formado pelas desintegrinas diméricas, diferentemente das proteínas dos grupos anteriores, monoméricas. As desintegrinas pertencentes ao quinto grupo podem ser homo ou heterodiméricas, e incluem, entre outras, a contortrostatina, EC3, EC6 e EMF10 (TRIKA *et al.*, 1994a; MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999a; MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000; MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999b), que apresentam aproximadamente 67 resíduos cada cadeia, com dez cisteínas envolvidas na formação de quatro pontes dissulfeto intracadeia e duas intercadeias (CALVETE *et al.*, 2000).

As desintegrinas monoméricas, inicialmente descritas como potentes inibidores da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, receptora para fibrinogênio plaquetário, são freqüentemente inibidores de outras integrinas RGD-dependentes, incluindo $\alpha_V\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1997; WIERZBICKA-PATYNOWSKY *et al.*, 1999). Em sua maioria, estas desintegrinas de apenas uma cadeia possuem a seqüência ativa tripeptídica RGD (McLANE *et al.*, 1998), com algumas exceções: barbourina e urussustatina2, ambas com a seqüência KGD (SCARBOROUGH *et al.*, 1991; OSHIKAWA & TERADA, 1999) e atrolisina E, que contém

um motivo MVD em seu “loop” inibitório (SHIMOKAWA *et al.*, 1998). Estas desintegrinas também exibem potente atividade inibitória contra a integrina plaquetária $\alpha_{IIb}\beta_3$. As desintegrinas monoméricas mostram níveis diferentes de afinidade e seletividade para as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$, que dependem fortemente dos aminoácidos adjacentes ao motivo RGD dentro dos “loops” de ligação à integrina (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1997; WIERZBICKA-PATYNOWSKY *et al.*, 1999).

Algumas desintegrinas não possuem a seqüência adesiva RGD, mas sim o motivo D/ECD (JIA *et al.*, 1997). Estas desintegrinas-*like* são originadas do processamento das SVMP da classe PIII, gerando-se proteínas maiores que possuem um domínio rico em cisteína além do desintegrina-*like*. Assim, estas proteínas possuem massas moleculares maiores que as desintegrinas-RGD, em torno de 23 e 32kDa (JIA *et al.*, 1997). O domínio desintegrina derivado das SVMP da classe PIII é um potente inibidor da ligação do colágeno a um de seus principais receptores, a integrina $\alpha_2\beta_1$ (SOUZA *et al.*, 2000).

As desintegrinas heterodiméricas exibem maior variabilidade nas seqüências de aminoácidos de seus sítios ativos (CALVETE *et al.*, 2003). Algumas possuem a seqüência RGD em ambas as subunidades (GASMI *et al.*, 2001), enquanto em outras a seqüência correspondente em uma subunidade pode ser MGD (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999), KGD (NIKAI *et al.*, 2000), WGD (CALVETE *et al.*, 2002), e MLD e VGD (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999; MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000). Há uma hipótese sugerindo o resíduo conservado de aspartato como responsável pela ligação das desintegrinas a integrinas, enquanto os outros dois resíduos do motivo podem fornecer a especificidade (CALVETE *et al.*, 2003).

Um grupo interessante é o das desintegrinas contendo a seqüência MLD; duas destas desintegrinas, EC3 e EC6, são potentes inibidores de integrinas α_4 e $\alpha_9\beta_1$ (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999; MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000). Estas desintegrinas mostram um alto grau de homologia entre si e com outras desintegrinas diméricas. Entretanto, apesar da estrutura entre as desintegrinas diméricas ser conservada, as atividades de inibição das integrinas exibidas por essas proteínas são variáveis.

DESINTEGRINAS E METÁSTASE

O processo de invasão e metástase é uma complexa cascata de eventos adesivos. As células tumorais apresentam alterações tanto nas adesões célula-célula como nas interações com a ECM. A adesão mediada por integrinas é crucial para a disseminação metastática. Este processo segue as seguintes etapas: (1) angiogênese; (2) disseminação das

células tumorais a partir do tumor primário; (3) interação dessas células com plaquetas; (4) adesão das células tumorais ao endotélio vascular e/ou membrana basal subendotelial; e (5) proliferação e supressão da apoptose (AKIYAMA *et al.*, 1995).

As células tumorais apresentam modificações na expressão de integrinas e/ou de moléculas relacionadas. A integrina $\alpha_v\beta_3$ participa ativamente na angiogênese e no crescimento do tumor, e tem sua expressão aumentada em células vasculares como resposta a fatores de crescimento ou a fatores angiogênicos tumorais (van WAES, 1995). As integrinas $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$, também são expressas em maior quantidade sob a ação de fatores de crescimento envolvidos na angiogênese (SENGER *et al.*, 1997). Sabe-se que tais integrinas desempenham importante papel na invasão tumoral e na metástase (CHAN *et al.*, 1991; ZUTTER *et al.*, 1995).

Estudos demonstraram que desintegrinas-RGD são capazes de inibir a adesão de células tumorais à matriz por competição específica com os receptores de integrinas e também a metástase (TRIKHA *et al.*, 1994; SHEU *et al.*, 1994; CHIANG *et al.*, 1995). A salmosina (*Agkistrodon halys brevicaudus*), uma desintegrina-RGD, reduziu de modo significativo o número de metástases experimentais *in vivo* da linhagem B16F10 de melanoma (KANG *et al.*, 2000) e induziu a desadesão de células de endotélio de capilar bovino e sua apoptose através da interação a integrina $\alpha_2\beta_1$ (KIWON *et al.*, 2003). A eristostatina é capaz de inibir em 87% a formação de metástases pulmonares em camundongos (DANEN *et al.*, 1998). Echistatina e bitistatina também foram testadas, mas não exibiram efeito significativo na inibição da formação de metástases. A desintegrina-RGD rhodostomina (*Calloselasma rhodostoma*), que se liga a integrina $\alpha_2\beta_1$ em células endoteliais, inibiu de maneira dose-dependente respostas angiogênicas induzidas por bFGF (*basic fibroblast growth factor* - um dos principais fatores de indução da angiogênese), incluindo proliferação, migração, invasão e diferenciação em HUVECs (*human umbilical veins endothelial cells*) *in vitro* e *in vivo* (YEH *et al.*, 2002). A saxatilina (*Gloidius saxatilis*), outra desintegrina-RGD, inibe fortemente a agregação plaquetária humana, a proliferação de HUVECs induzida por bFGF e a migração de células de músculo liso induzida pela vitronectina (DOO-SIK *et al.*, 2002).

A função biológica das desintegrinas-like também está sendo caracterizada. Catrocollastatina-C, halyssetina e jararagina-C inibem a agregação plaquetária induzida por colágeno (Shimokawa *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000), sendo que jararagina-C também inibe a agregação induzida por ADP e, ainda, a adesão de células transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$

e de células ECV-304 e HUVEC ao colágeno tipo I (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2001). Alternagina-C (*Bothrops alternatus*) inibe a adesão mediada pelo colágeno tipo I de células transfectadas K562-- $\alpha_2\beta_1$, de forma dose-dependente (SOUZA *et al.*, 2000), e também de fibroblastos humanos (COMINETTI *et al.*, 2004) e células tumorais das linhagens ECV-304, HeLa e MDA-MB-231 a este mesmo ligante (resultados não publicados).

As desintegrinas diméricas, assim como as desintegrinas monoméricas, interagem com diferentes integrinas, tanto em células normais como em tumorais. Contortrostatina (CN), uma desintegrina homodimérica-RGD (*Agkistrodon contortrix contortrix*), inibe agregação plaquetária (CLARK *et al.*, 1994). A CN inibe a adesão de células de melanoma humano, células de câncer de mama e células de carcinoma de bexiga a vitronectina através da interação com as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ (ZHOU *et al.*, 2000a). Em um modelo de metástase experimental *in vivo*, CN inibiu a progressão tumoral - através da interação com $\alpha_v\beta_3$ (ZHOU *et al.*, 2000b).

A desintegrina heterodimérica EC3 (*Echis carinatus suchoreki*) apresenta subunidades com as seqüências adesivas VGD e MLD. Esta desintegrina é capaz de inibir a adesão de células através da interação com as integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$, interagindo de modo menos intenso com $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1999a).

ADESÃO CELULAR E INTEGRINAS

A adesão das células ao seu meio é importante na determinação da forma celular e na manutenção da função celular apropriada e integridade tecidual. Tal ligação permite a ancoragem das células e fornece sinais que direcionam a migração (Carter, 1965; Ali, & Hynes, 1978; Thiery, *et al.*, 1985) e a diferenciação (Grobstein, *et al.*, 1975; Hay, 1985). As células podem ligar-se com outras células (EDELMAN, 1983) ou com componentes da matriz extracelular, ECM (RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1986), formando tecidos.

A ECM é composta de uma complexa rede de proteínas e polissacarídeos, fatores de crescimento produzidos e secretados principalmente pelos fibroblastos do tecido conjuntivo. Estas células participam da organização da ECM (GEIGER *et al.*, 2000). As diferenças nas combinações de colágenos, proteoglicanas, elastina, ácido hialurônico e várias glicoproteínas tais como fibronectina e laminina originam a grande diversidade morfofuncional dos tecidos.

As interações entre as células e a ECM são mediadas por moléculas específicas, localizadas nas membranas celulares. Tais moléculas podem ser classificadas em 6 grupos, de acordo com sua estrutura primária: selectinas (LASKY, 1992), caderinas (TAKEICHI, 1987), membros da superfamília de imunoglobulinas (Ig) (BRUMMENDORF & RATHJEN, 1995), adressinas (WAGNER & WYSS, 1994), as integrinas (HYNES, 1987) e as ADAMs, recentemente incluídas (HORWITZ & HUNTER, 1996; BLACK & WHITE, 1998; BLOBEL, 1997).

As integrinas são os principais receptores na adesão celular às proteínas da ECM e também desempenham papéis importantes em certas adesões célula-célula. As interações das integrinas com seus ligantes são essenciais em diversos processos, como desenvolvimento embrionário, inflamação, homeostase, cicatrização e câncer (HYNES, 1992; RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1987).

A terminologia “integrina” foi aplicada em 1987 (HYNES, 1987) para descrever uma família de receptores expressos na membrana celular que integram a ECM ao citoesqueleto intracelular para mediar migração e adesão das células. Estas proteínas são restritas aos metazoários (animais pluricelulares); não há homólogos detectados em procariotos, plantas ou fungos (WHITTAKER & HYNES, 2002).

A estrutura das integrinas é formada por um heterodímero transmembrana, com as subunidades glicoprotéicas α (120 a 180kDa) e β (90 a 110kDa), ligadas não covalentemente entre si (Figura 4). Cada subunidade contém um domínio extracelular (700-900 aminoácidos), um pequeno domínio transmembrana e um domínio citoplasmático menor que o extracelular (20-60 aminoácidos) (HUMPRIES, 2000; HYNES, 2002).

Atualmente são identificadas oito subunidades β e 18 subunidades α em mamíferos, sendo conhecidos 24 heterodímeros distintos (Figura 5). A diversidade de integrinas é expandida por *splicing* alternativo, modificações pós-traducionais e interações com outras moléculas de superfície celular e intracelular (GREEN *et al.*, 1998; PORTER & HOGG, 1998; DE MELKER & SONNENBERG, 1999).

As integrinas podem se ligar tanto a moléculas de superfície celular como à proteínas da ECM. As moléculas de adesão que podem interagir com as integrinas são as ICAMs (*Intracellular cell adhesion molecule*), as MadCAMs (*Mucosal addressin cell adhesion molecule*) e as VCAMs (*Vascular cell adhesion molecule*). A variedade de proteínas da ECM com as quais as integrinas podem se ligar inclui a fibronectina, a vitronectina, o fibrinogênio, o componente iC3b do sistema complemento, entre outros (tabela 1) (SPRINGER, 1990; 1994). Todas as integrinas ligam-se aos seus ligantes de maneira cátion

divalente-dependente com Mn^{+2} e Mg^{+2} geralmente promovendo a ligação e o Ca^{+2} tendo efeito oposto.

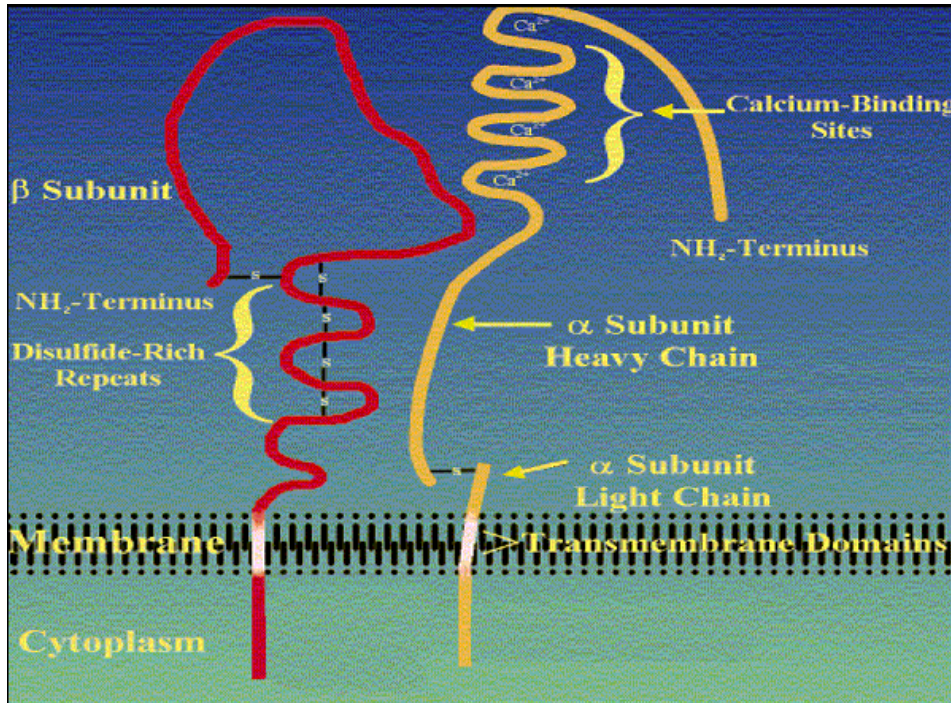


Figura 4 – Esquema das subunidades que compõem uma integrina.
 Extraído de: www.bendermedsystems.com/108.html Acesso: 01/02/2004.

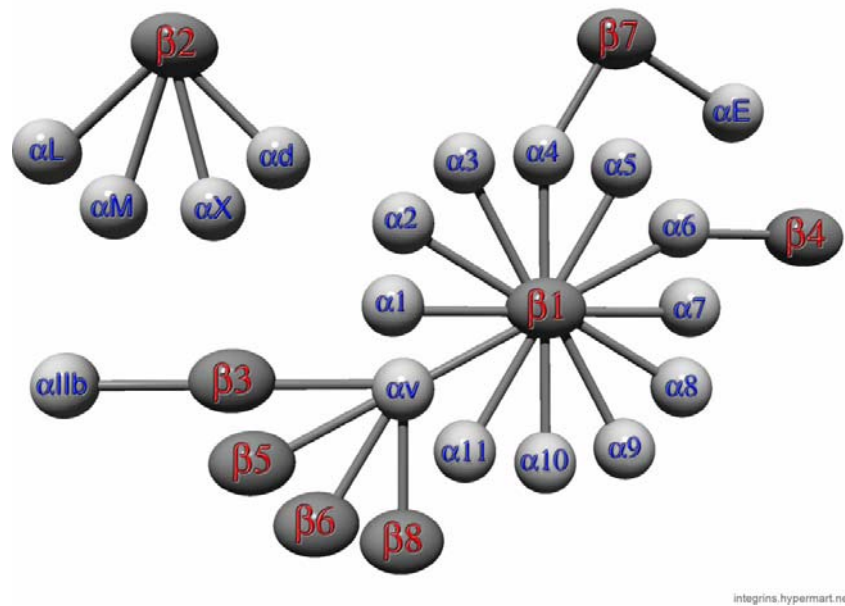


Figura 5 – Esquema das diferentes associações entre as subunidades α e β e divisão dos heterodímeros em subgrupos.

Extraído de: <http://members.lycos.nl/jkoster/wallpapers/itgfamgrey.jpg>
 Acesso: 01/02/2005.

Algumas integrinas parecem ligar-se a apenas um tipo de proteína da matriz, enquanto que outras reconhecem mais de um tipo de proteína. Da mesma forma, as proteínas da ECM podem ser reconhecidas por várias integrinas (HYNES, 1987; ALBELDA, 1993).

Baseando-se na subunidade β , as integrinas podem ser classificadas em subgrupos (tabela 1), com ligantes e localização específicos.

Tabela 1 – Ligantes de integrinas e suas distribuições celulares*

SUBUNIDADE		LIGANTES	DISTRIBUIÇÃO CELULAR	
			Não-leucócito	Leucócito
β_1	α_1	CO, laminina	F, MB	AtB, atT
	α_2	CO, laminina	P, F, EN, EP	AcT
	α_3	CO, laminina, fibronectina, trombospondina	EP, F	
	α_4	Fibronectina, VCAM-1	NC, F	B, T, M, LGG
	α_5	Fibronectina	F, EP, EN, P	Th, T
	α_6	Laminina	P	T
	α_7	Laminina	MIO	
	α_8	OP, vitronectina, fibronectina, tenascina	EP, CN	
	α_9	Tenascina, ostopontina, VCAM-1	MIO, EP	NEU
	α_{10}	CO	CON	
	α_{11}	CO	MÊS	
β_2	α_V	OP, vitronectina, fibronectina	F	
	α_L	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3		B, T, M, G
	α_M	IC3b, fibrinogênio, fator X, ICAM-1		M, G
	α_X	IC3b, fibrinogênio		M, G
β_3	α_D	VCAM-1, ICAMs		
	α_{lib}	Fibrinogênio, fibronectina, vWF, vitronectina, trombospondina, CO	P	
β_4	α_V	Fibronectina, fibrinogênio, vWF, trombospondina, vitronectina, CO, OP	EM	
	α_6	Laminina	C	
β_5	α_V	Fibronectina, vitronectina	C, F, EP, AST	
β_6	α_V	Fibronectina, Tenascina	C, EP	
β_7	α_4	Fibronectina, VCAM, MAdCAM		
	α_E	Caderina E		LIE
β_8	α_V	Fibronectina, VCAM-1, laminina, CO	AST	LIE

*Baseado em CAMPER *et al.*, 1998; MILNER *et al.*, 1999; PETRUZZELLI *et al.*, 1999; TAOOKA *et al.*, 1999. AST = astrócitos; atB = células B ativadas; atT = células T ativadas; B = células B; C = células de carcinoma; CON = condrócitos; CN = células derivadas da crista neural; CO = colágenos; EM = endotélio; EP = epitélio; F = fibroblastos; G = granulócitos; LIE = linfócitos granulares grandes; M = monócitos; MB = membranas basais; MÊS = células mesenquimais; MIO = miócitos; NEU = neutrófilos; OP = osteopontina; P = plaquetas; T = células T; Th = timócitos; vWF = Fator von Willebrand.

A subunidade β_1 , por exemplo, interage com 12 subunidades α diferentes (α_1 - α_{11} e α_V), e mediam interações com proteínas da ECM tais como colágeno, lamininas e fibronectina. As integrinas $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ são principais as ligantes de colágeno (IGNATIUS *et al.*, 1990; GULDBERG *et al.*, 1992; STAAZ *et al.* 1989; HOLMVALL *et al.*, 1995). A integrina $\alpha_5\beta_1$ é o receptor para fibronectina e participa da formação de tecidos e órgãos durante o desenvolvimento embrionário (HYNES, 1996). TAOOKA *et al.* (1999) demonstraram que a integrina $\alpha_9\beta_1$ é expressa em neutrófilos e suas interações com VCAM-1 desempenham papel importante no extravasamento dessas células em sítios de inflamação.

O subgrupo β_2 consiste de quatro receptores integrina, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_1\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$ e $\alpha_D\beta_2$, restritos aos leucócitos. Estas integrinas mediam principalmente interações célula-célula através de ligantes celulares específicos, como as VCAMs expressas em células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. Estas integrinas estão envolvidas em muitos aspectos da função dos leucócitos, incluindo resposta imune, adesão a e transmigração através do endotélio, fagocitose de patógenos e ativação de leucócito. A importância de integrinas β_2 é reforçada pela susceptibilidade a severas infecções de pacientes que perdem essas integrinas (HARRIS *et al.*, 2000). A integrina $\alpha_M\beta_2$ desempenha um papel multifuncional em leucócitos, sendo importante na adesão leucocitária e transmigração através do endotélio, na ativação de neutrófilos e monócitos, na fagocitose de material estranho e na apoptose (PLOW *et al.*, 2000; SPRINGER, 1995). Uma grande variedade de ligantes protéicos e não-protéicos interagem com esta integrina, incluindo fibrinogênio (ALTIERI *et al.*, 1988), ICAM-1 (DIAMOND *et al.*, 1990), C3bi (WRIGHT *et al.*, 1983) e fator inibidor de neutrófilo (MOYLE *et al.*, 1994).

O subgrupo das integrinas β_3 consiste de duas integrinas, $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_V\beta_3$, as quais podem interagir com diversos ligantes, como a fibronectina, o fibrinogênio, a vitronectina, a trombospondina e o fator von Willebrand (GRENN *et al.*, 1998; COPPOLINO & DEDHAR, 2000). A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (gpIIb/IIIa) é expressa em plaquetas e megacariócitos (PHILLIPS *et al.*, 1991) e reconhece a seqüência RGD do fibrinogênio e está envolvida na agregação plaquetária (WAGNER & WYSS, 1994). A integrina $\alpha_V\beta_3$, também referida como o receptor de vitronectina, é expressa em vários tipos celulares (MOUSA, 1999; SAMANEM *et al.*, 1997; HORTON *et al.*, 1996), incluindo osteoclastos, células do músculo liso de vasos, células endoteliais e diversas células tumorais. Estudos mostraram que a integrina $\alpha_V\beta_3$ transduz sinais de sobrevivência dependente da adesão importantes para angiogênese, cicatrização, osteoporose e metástase tumoral (CHERESH, 1987; CHERESH & SPIRO, 1987; GLADSON & CHERESH, 1991; MIYUCHI *et al.*, 1991; SCHWARTZ, 1993;

BROOKS *et al.*, 1994a, b; MONTGOMERY *et al.*, 1994; DRAKE *et al.*, 1995; SCATENA *et al.*, 1998).

A maior parte das interações das integrinas é heterotípica, como a ligação de uma integrina a uma proteína da ECM, por exemplo, mas podem ocorrer também interações heterofílicas, como a ligação $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$ que media a adesão intercelular entre queratinócitos (SYMINGTON *et al.*, 1993) e há relato de interações homofílicas entre integrinas $\alpha_3\beta_1$ (SRIRAMARAO *et al.*, 1993).

Conforme foi descrito, as integrinas reconhecem um surpreendente número de proteínas funcionalmente diversas como ligantes. A seqüência RGD serve como motivo de reconhecimento em múltiplos ligantes, como a fibronectina, a vitronectina e o fibrinogênio (YAMADA, 1991), para diferentes integrinas (tabela 2). Drogas tendo como alvo integrinas têm sido desenvolvidas baseadas nas seqüências reconhecidas por esses receptores. Drogas desenhadas a partir da estrutura da seqüência de aminoácidos RGD, por exemplo, têm sido usadas ou testadas para inibirem a função de integrinas para o tratamento de trombose, inflamação, aterosclerose, osteoporose e câncer (HART *et al.*, 1995).

Embora peptídeos RGD inibam a ligação de ligantes às integrinas com uma especificidade de reconhecimento RGD (tabela2), estes receptores podem discriminar entre ligantes contendo essa seqüência. A especificidade pode ser determinada pelo contexto da seqüência RGD, como seus resíduos flanqueadores e a conformação tridimensional da seqüência, além de pequenas características individuais (HAAS & PLOW, 1994).

As seqüências RGD não são as únicas reconhecidas pelas integrinas. O subgrupo de integrinas α_4/α_9 ($\alpha_4\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$), por exemplo, pode reconhecer as seguintes seqüências que possuem Asp: LDVP (fragmento CS-1 de fibronectina), IDSP (VCAM-1), LDTS (MadCAM-1), AEIDGIEL (tenascina-C) (NEWHAM *et al.*, 1997; YOKOSAKI *et al.*, 1998; EVANS, 2001). A integrina $\alpha_9\beta_1$ interage com seqüências similares a ECD da ADAM2: RGDCD (ADAM15 humana), TDDCD (ADAM15 de camundongo), SNSCD (ADAM12 de humanos e camundongos) e SGACD em formas mutadas de ADAM15 humana (ETO *et al.*, 2000).

As regiões N-terminais extracelulares das duas subunidades das integrinas são importantes na ligação dos ligantes (ELICES & HEMLER, 1989; LANGUINO *et al.*, 1989). Uma característica notável é comum aos receptores primários de colágeno: a presença de uma seqüência com cerca de 190 resíduos denominada domínio-I (*inserted*) na região N-terminal da subunidade α . Essa seqüência contém um motivo MIDAS (*metal ion-dependent adhesion*

site) que está envolvido na ligação dos ligantes (CALDERWOOD *et al.*, 1995; KERN *et al.*, 1993; TUCKWELL *et al.*, 1996; KAMATA & TAKADA, 1994). (XIONG, 2001) As subunidades β também contribuem para a ligação do ligante às integrinas. Estudos sobre a região central da subunidade β_2 mostram que ela apresenta uma região MIDAS, como o domínio-I da subunidade α , sugerindo que possa haver uma estrutura domínio-I-like (LEE *et al.*, 1995; TUCKWELL *et al.*, 1997). Esta região desempenha um papel crítico na mediação da ligação do ligante as integrinas. A seqüência proposta para o motivo MIDAS em β_2 foi implicada na ligação de fibrinogênio, C3bi e ICAM-1 a $\alpha_M\beta_2$ (BAJT *et al.*, 1995; ZHANG & PLOW, 1996).

Integrinas e sinalização

As interações das integrinas com os diversos ligantes podem disparar cascatas de sinalização que regulam o crescimento celular, morte celular, migração e remodelamento tecidual (CLARK & BRUGGE, 1995). Estes receptores fornecem uma ligação física entre o meio extracelular incluindo a superfície celular e moléculas da ECM, e o sistema de microfilamentos contráteis de actina (HYNES, 1992; BRAKEBRUSCH *et al.*, 1997; APLIN *et al.*, 1998).

A informação de sinalização gerada pelas interações de ligação entre as integrinas e os ligantes é transduzida através da membrana plasmática em uma variedade de vias de sinalização em um processo denominado sinalização *outside-in*. Reguladores intracelulares, por sua vez, modificam as propriedades externas de ligação da integrina ao ligante em um processo chamado sinalização *inside-out*. A figura 6 mostra os principais eventos de sinalização celular desencadeados.

Estudos mostraram que muitas proteínas do citoesqueleto, de sinalização e de adaptação interagem com as caudas citoplasmáticas das integrinas (LIU *et al.*, 2000; ZAMIR & GEIGER, 2001), algumas das quais regulam o estado de ativação da integrina (tabela 2). Tais moléculas são ativadas de acordo com o tipo celular e o estímulo recebido pela célula (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; COPPOLINO & DEDHAR, 2000; LIU *et al.*, 2000).

Sinalização *outside-in*

A ligação do ligante à integrina leva a reunião (*clustering*) desses receptores e (LaFLAMME & AUER, 1996) à formação de sítios especializados de adesão denominados

adesões focais (FAs) (LO & CHEN, 1994). Este complexo inclui proteínas estruturais e de sinalização, como as integrinas, proteínas do citoesqueleto e quinases, que incluem FAK (*focal adhesion kinase*) e Src, entre outras (tabela 2). As FAs asseguram a adesão ao substrato, bem como a localização direcionada do citoesqueleto e dos componentes de sinalização, sendo consideradas organelas de transdução de sinais dependente da adesão (LO & CHEN, 1994).

Tabela 2 – Proteínas ligantes das subunidades α e β das integrinas*

Proteína ligante	Subunidade da integrina
<i>Proteínas que se ligam a actina</i>	
Talina	$\beta_1, \beta_2, \beta_3$
Filamina	$\beta_1, \beta_2, \beta_1, \beta_7$
α -actinina	β_1, β_2
F-actina	α_2
Miosina	β_3
Skelemina	β_1, β_3
<i>Proteínas sinalizadoras</i>	
ILK	β_1, β_3
FAK	$\beta_1, \beta_2, \beta_3$
Citoesina-1	β_2
Citoesin-3	β_2
<i>Outras proteínas</i>	
Paxilina	$\beta_1, \beta_3, \beta_4$
Grb2	β_3
Shc	β_3
β_3 -endotoxina	β_3
TAP-20	β_5
CIB	β_{IIb}
Calreticulina	α
Caveolina	α
Rack1	$\beta_1, \beta_2, \beta_5$
WAIT-1	β_7
JAB1	β_2
Melusina	β_1
MIBP	β_1
ICAP-1	β_1
CD98	β_1, β_3
DRAL/FHL2	β

*Extraído e modificado de LIU *et al.*, 2000. ILK = *integrina linked kinase*; FAK = *Focal Adhesion kinase*; CIB = *Calcium- and integrin-binding protein*; Rack = *Receptor for activated protein kinase-C*; WAIT = *WD protein associated with integrin tails*; JAB = *Jun-activation-domain-binding protein*; MIBDP = *Muscle-specific β_1 - integrin binding protein*; ICAP = *Integrin cytoplasmic associated protein*.

A FAK possui papel chave na sinalização mediada por integrinas (ZACHARY & ROZENGURT, 1992; SCHALLER & PARSONS, 1994). A ativação da FAK e sua fosforilação dependem da ligação da integrina aos seus ligantes (GUAN *et al.*, 1991; KORNBERG *et al.*, 1991; SCHWARTZ *et al.*, 1995), sendo que elas podem ser ativadas pelo domínio citoplasmático da subunidade β da integrina (AKIYAMA *et al.*, 1994; LUKASHEV *et al.*, 1994) e por interações de proteínas do citoesqueleto associadas a integrina. Uma vez ativada e fosforilada, a FAK se associa a várias moléculas de sinalização, como a Src. Esta associação resulta na ativação de ambas, levando a transmissão de sinais (figura 6).

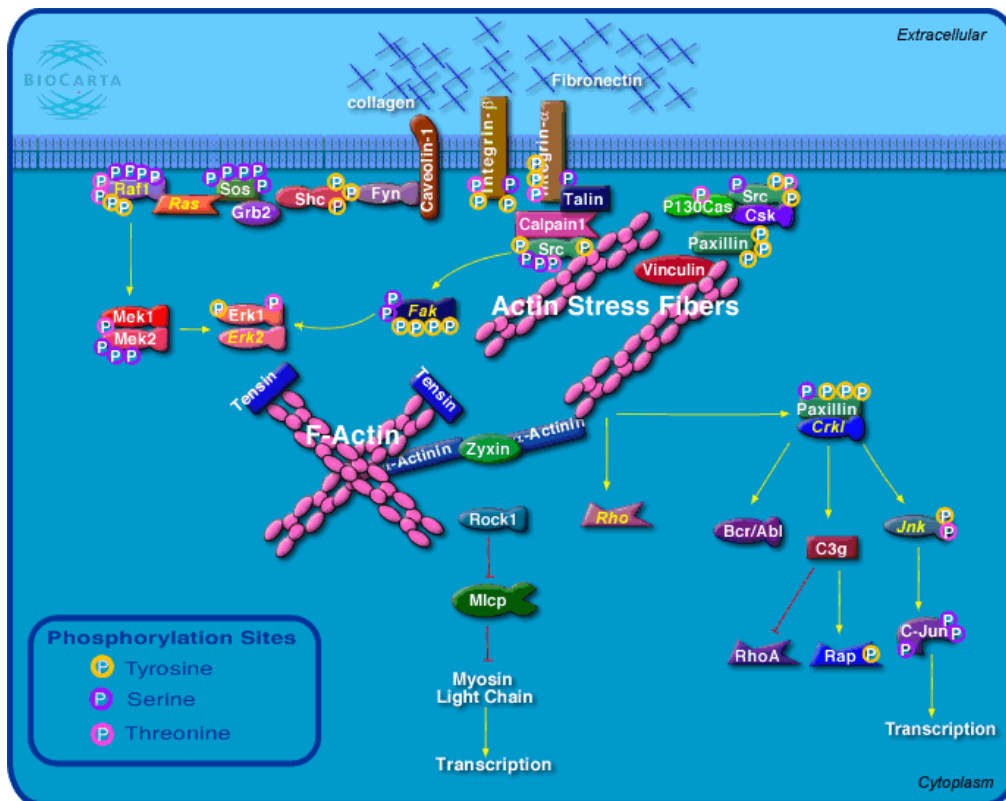


Figura 6 – Principais eventos de sinalização celular desencadeados pela ligação das integrinas a ligantes na ECM.

Extraído de: http://cgap.nci.gov/Pathways/BioCarta_Pathways

Acesso: 01/02/2005.

Entre as vias de sinalização ativadas pela FAK mediadas por integrinas, está a via MAPK (*mitogen activated protein kinase*), uma das principais (SCHLAEPFER *et al.*, 1994). As MAPKs localizam-se em pontos de convergência de múltiplas vias de sinalização, participando de diversos processos celulares importantes através da regulação de expressão

gênica, mitose, migração, proliferação e morte celular (LIN *et al.*, 1997; MIYAMOTO *et al.*, 1996; APLIN & JULIANO, 1999; JOHNSON & LAPADAT, 2002).

Sinalização *inside-out*

É vital que as integrinas controlem seu estado de ativação de forma que elas só se liguem a um ligante de maneira regulada. (Humphries 2003) sendo que para isso, a conversão deve ser controlada nas faces extra e intracelular. Embora a reunião (*clustering*) de receptores de baixa afinidade reforce a avidéz da ligação dos ligantes e a formação de complexos de adesão (HOGG *et al.*, 2002), muitas evidências sugerem que a aquisição de habilidade para a ligação ao ligante e a ativação da integrina envolvem mudanças conformacionais (HUMPHRIES, 2000).

Os domínios citoplasmáticos das integrinas possuem geralmente menos de 50 aminoácidos, sendo que as seqüências da subunidade β exibem maior homologia entre si do que as subunidades α . Assim, sugere-se que a subunidade β seja o principal sítio para a ligação de moléculas do citoesqueleto e de sinalização, ao passo que a subunidade α possui um papel regulatório. Tal hipótese implica que há interação entre os dois domínios citoplasmáticos, o que foi confirmado através de estudos bioquímicos e estruturais (VILOGRADOVA *et al.*, 2002). As regiões próximas à membrana em ambas subunidades são requeridas para manter as integrinas no estado inativo, já que ocorrem mudanças estruturais principalmente nessas regiões (HUGHES *et al.*, 1996).

A transição das integrinas de um estado de baixa para um de alta afinidade é acompanhada por mudança conformacional na molécula (TAKAGI & SPRINGER, 2002). Recentes análises estruturais mostraram que nas integrinas em estado de baixa afinidade, a região N-terminal de ligação ao ligante no domínio extracelular fica “fechada”, voltada para a membrana (XIONG *et al.*, 2001; XIONG *et al.*, 2002). Na ativação da integrina, a região de interação se posiciona de modo a permitir a ligação do ligante (BELGOVA *et al.*, 2002; TAKAGI *et al.*, 2002). Isto é acompanhado por várias mudanças conformacionais sutis na região de ligação da integrina que criam um sítio de alta afinidade ao ligante (TAKAGI & SPRINGER, 2002).

Integrinas e fatores de crescimento

Estudos revelaram interações entre as integrinas e a sinalização de fatores de crescimento/citocinas em muitos processos celulares (BRAKEBRUSCH & FÄSSLER, 2003). Fatores como PDGF (*Platelet-derived growth factor*), receptores para insulina, EGF (*Epidermal growth factor*) e VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) participam destas interações.

Para responderem aos sinais dos fatores de crescimento, as células devem interagir com a ECM. MIYAMOTO *et al.* (1996) mostraram que integrinas recrutam GFRs (*growth factors receptors*) bem como componentes do citoesqueleto, moléculas adaptadoras e tirosina-quinases não-receptoras para sítios de adesão. A importância da sinergia GFR-integrina é ilustrada para a progressão do ciclo celular (ASSOIAN & SCHWARTZ, 2001) e para a migração celular (SIEG *et al.*, 2000; IVANKOVIC-DIKIC *et al.*, 2000). Em fibroblastos e células endoteliais, por exemplo, MORO *et al.* (1998) demonstraram que a adesão às proteínas da ECM induz a ativação parcial do GFR, levando a ativação da MAPK e a sobrevivência celular dependente de ancoragem. Estudos posteriores revelaram que a FAK interage diretamente com o domínio citoplasmático do GFR, podendo agir como uma ponte entre esse receptor e os componentes de ligação a integrina (SIEG *et al.*, 2000). Além disso, fatores de crescimento, como o VEGF, podem ativar integrinas, aumentando a capacidade de ligação das células a seus ligantes (BYZOVA *et al.*, 2000).

VEGF

A angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos, é um evento fortemente regulado que desempenha um importante papel no desenvolvimento embrionário, no crescimento folicular, na cicatrização e em condições patológicas como crescimento e progressão tumoral (PLATE *et al.*, 1994; HANAHAN *et al.*, 1996). O crescimento e a metástase de tumores sólidos é dependente da angiogênese. Na ausência de neovascularização, os tumores se tornam necróticos ou apoptóticos (FOLKMAN *et al.*, 1992). A angiogênese tumoral envolve vários processos, incluindo ativação de células endoteliais, proliferação, migração e infiltração tecidual de vasos pré-existentes, disparados por fatores de crescimento angiogênicos específicos, produzidos pelas células tumorais e pelo estroma circundante (PLATE *et al.*, 1994; HANAHAN *et al.*, 1996; FOLKMAN *et al.*, 1992; NAGY *et al.*, 1989). Entre tais fatores de crescimento identificados como reguladores da angiogênese (KLAGSBRUN *et al.*, 1991), VEGF (HANAHAN *et al.*, 1996) e seus receptores

desempenham papel chave na angiogênese tumoral (DVORAK *et al.*, 1999; NEUFELD *et al.*, 1999; KLAGSBRUN & D'AMORE, 1996).

Os VEGFs (*vascular endothelial growth factor*) são glicoproteínas homodiméricas de 34-42 kDa. Este fator de crescimento, descoberto por Dvorak *et al.* por volta de 1980 (SENGER *et al.*, 1983), induz proliferação, adesão e migração de células endoteliais (BYZOVA *et al.*, 2000), expressão gênica (SENGER, 2001) e permeabilidade vascular (SENGER *et al.*, 1983, 1990), etapas envolvidas na angiogênese (FERRARA & ALITALI, 1999; SENGHER *et al.*, 1986; LEUNG *et al.*, 1989) (Figura 7). O VEGF desempenha papel importante não apenas na angiogênese fisiológica, como também em desordens angiogênicas, incluindo isquemia, inflamação e câncer (FERRARA & HENZEL, 1989; FERRARA *et al.*, 1992; CARMELIET, 2003; CROSS *et al.*, 2003).

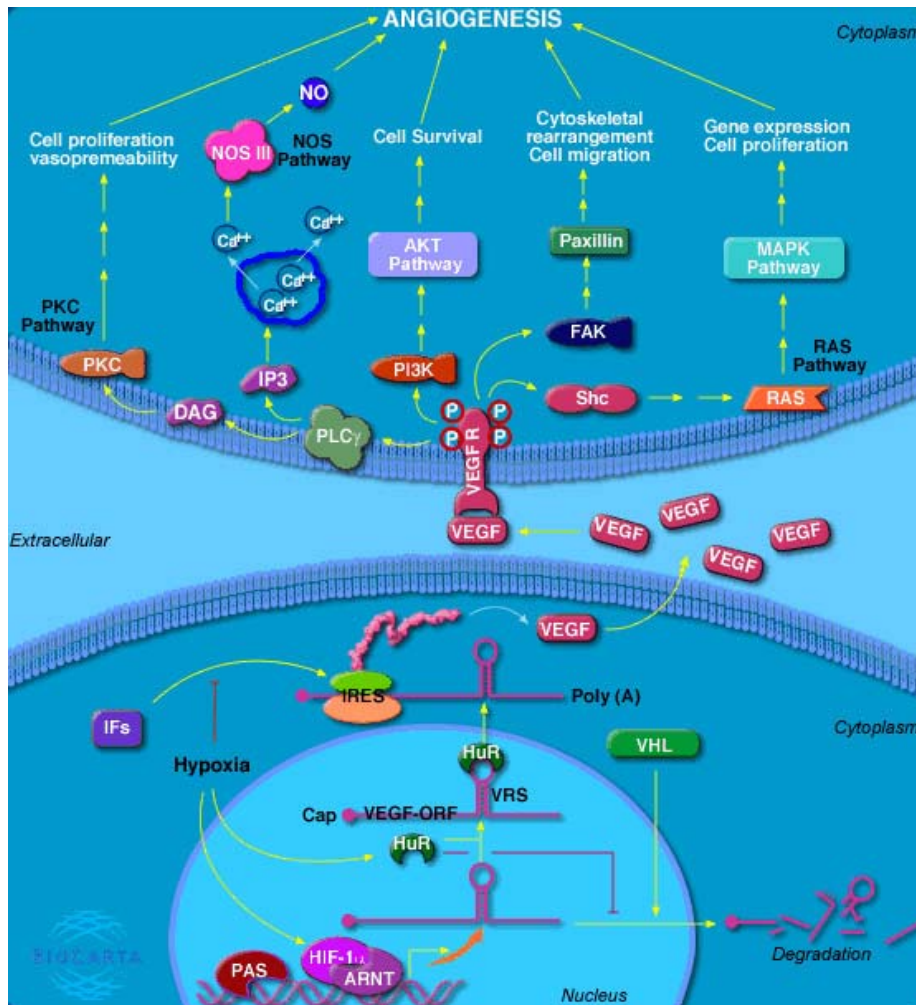


Figura 7 – Sinalização desencadeada por VEGF.

Extraído de: http://cgap.nci.gov/Pathways/BioCarta_Pathways

Acesso: 01/02/2005.

O VEGF é expresso não apenas em células endoteliais, mas em células variadas em resposta a outros fatores de crescimento, como EGF, e mediadores solúveis, como o TGF- β (*Transforming growth factor- β 1*), e também sob condições de *stress* como a hipóxia (HARRIS, 2002). (Granato 2003). Os receptores de VEGF (VEGFR) são expressos em diversos tipos celulares, como monócitos, células musculares lisas, células endoteliais e células hematopoiéticas (MATSUMOTO *et al.*, 2001).

VEGF e integrinas

A angiogênese requer a coordenação de receptores de fatores de crescimento e integrinas (BROOKS *et al.*, 1994; FRIEDLANDER *et al.*, 1995), levando a ativação de sinais *outside-in* em células endoteliais (ELICIERI *et al.*, 1998; SHORT *et al.*, 1998). Duas vias de angiogênese induzida por fator de crescimento foram identificadas, nas quais o bFGF induz a angiogênese dependente da ligação a integrina $\alpha_v\beta_3$, ao passo que o VEGF induz angiogênese dependente da ligação a integrina $\alpha_v\beta_5$ (FRIEDLANDER *et al.*, 1995). Trabalhos recentes indicam que Src e FAK são ativados por receptores de fatores de crescimento e/ou após a adesão celular mediada por integrinas (PARSONS & PARSONS, 1997; SCHLAEPFER & HUNTER, 1998). Src e FAK também se associam ao domínio citoplasmático de GFRs (SIEG *et al.*, 2000) e após a adesão mediada pela integrina, FAK pode recrutar Src para as FAs levando a ativação da MAPK (WARY *et al.*, 1998). Há evidências que VEGF e outros fatores de crescimento ativam Src quinase, que induz a fosforilação da FAK, facilitando sua associação com a integrina $\alpha_v\beta_5$ *in vivo* e *in vitro*. A deficiência de Src ou o bloqueio de sua atividade inibem a formação de um complexo FAK/ $\alpha_v\beta_5$ induzido por VEGF.

ESTUDO DOS VENENOS DE SERPENTES

O estudo dos componentes de venenos de serpentes tem contribuído não apenas para a exploração do seu próprio potencial como modelo para o desenvolvimento de terapias para diversas doenças, como o câncer, mas também para o aprofundamento e compreensão de vários processos biológicos. As desintegrinas, em especial, têm se mostrado de grande importância no que se refere ao estudo dos processos intermediados pelas integrinas, as quais estão envolvidas tanto em situações fisiológicas normais como em patologias. Por outro lado, as desintegrinas estão presentes em quantidades muito pequenas nos venenos, exigindo processos demorados e sofisticados para o seu completo isolamento.

Desta forma, a busca por novas desintegrinas, bem como o desenvolvimento de sistemas de produção destas proteínas na forma recombinante podem contribuir significativamente para a compreensão do mecanismo de ação destas proteínas, visando o seu enorme potencial de uso clínico.

Nosso laboratório vem estudando SVMPs e desintegrinas, tanto nativas como recombinantes, há alguns anos. A BaG é uma SVMP dimérica de classe PIII isolada do veneno de *Bothrops alternatus* (COMINETTI *et al.*, 2003). Esta metalopeptidase, que possui atividade hemorrágica, reagiu positivamente contra anticorpos anti-echistatina, uma desintegrina-RGD, sugerindo a presença dessa seqüência adesiva em seu domínio desintegrina (COMINETTI *et al.*, 2003). BaG mostrou-se inibidora da ligação da fibronectina à integrina $\alpha_5\beta_1$ e também da agregação plaquetária induzida por ADP, provavelmente pela interação com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, atividades descritas para desintegrinas com a seqüência adesiva RGD.

Outra SVMP de classe PIII estudada pelo nosso grupo é alternagina, isolada do veneno de *Bothrops alternatus* (SOUZA *et al.*, 2000). Alternagina inibe a adesão de células transfectadas K562- $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I de maneira dose-dependente (SOUZA *et al.*, 2000).

SVMPs recombinantes também foram produzidas em nosso laboratório. ACLF, uma SVMP de classe PI não hemorrágica e com atividade fibrinolítica, foi produzida na forma recombinante em bactéria, com refolding satisfatório, obtendo-se uma proteína ativa (SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2000). Recentemente, pro-ACLF, o zimogênio da ACLF, também foi produzido com sucesso em sistema bacteriano (RAMOS *et al.*, 2002).

Entre as desintegrinas estudadas está alternagina-C (ALT-C), uma desintegrina-like derivada do processamento da SVMP alternagina (SOUZA *et al.*, 2000). ALT-C, assim como sua proteína precursora, se liga ao receptor do colágeno, a integrina $\alpha_2\beta_1$, em diversos tipos celulares (SOUZA *et al.*, 2000). ALT-C é capaz de promover a proliferação celular em HUVECs (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*) e induzir a expressão de VEGF em fibroblastos humanos (COMINETTI *et al.*, 2004).

Uma nova desintegrina-RGD, DisBa-01, foi clonada (*Bothrops alternatus*) e produzida em sistema bacteriano de expressão heteróloga. Em ensaios preliminares, a proteína purificada mostrou indícios de forte ligação com integrinas possuidoras de subunidade β_3 (manuscrito em preparação, processo Fapesp n° 01/10282-6).

ACLD-C

A partir da clonagem de outra SVMP de classe PIII denominada ACLD, da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* (SELISTRE-DE-ARAÚJO & OWNBY, 1997), foi subclonada a ACLD-C (IEMMA, tese de doutorado, 2002), uma desintegrina-*like* com a seqüência adesiva DCD (figura 8) e um domínio rico em cisteína. Um sistema de produção de ACLD-C recombinante foi desenvolvido, obtendo-se a desintegrina fusionada ao C-terminal da MBP (*maltose binding protein*). MBP/ACLD-C foi expressa na forma solúvel e ativa, sendo capaz de inibir a adesão da integrina $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I de maneira dose-dependente (IEMMA, tese de doutorado, 2002). Entretanto, a desintegrina foi expressa e purificada com baixo rendimento (0,4mg/L de cultura) e sem a retirada da MBP. ACLD-C ainda não foi isolada o veneno bruto.

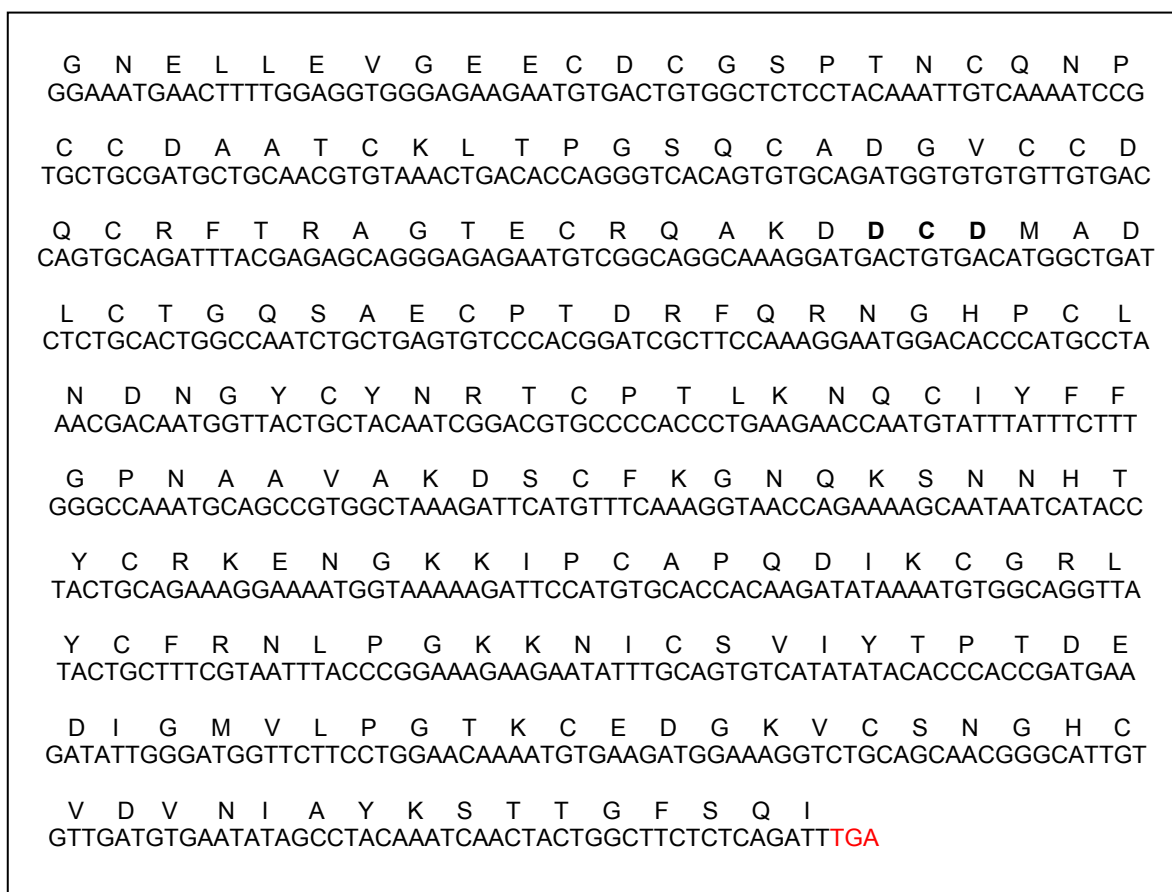


Figura 8 – Seqüência de aminoácidos/nucleotídeos da desintegrina-*like* ACLD-C. As linhas superiores representam as seqüências de aminoácidos traduzidas a partir da seqüência de nucleotídeos da ACLD-C (linhas inferiores). Negrito: seqüência adesiva da desintegrina. Vermelho: *stop codon*.

Esta dissertação está dividida em dois capítulos para melhor compreensão. O primeiro capítulo trata da otimização da expressão, purificação e clivagem da ACLD-C, uma proteína tipo desintegrina da serpente *Agkistrondon contortrix laticinctus*. O segundo capítulo descreve o estudo dos efeitos da ACLD-C e outras duas desintegrinas, echistatina e EC6, sobre a expressão de VEGF em fibroblastos humanos.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

Capítulo 1 - Otimizar a expressão e a purificação da MBP/ACLD-C, uma proteína desintegrina-*like* da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* produzida com a proteína de fusão MBP, e clivar o produto de fusão para obtenção da ACLD-C recombinante livre.

Capítulo 2 - Estudar os efeitos das desintegrinas ACLD-C (desintegrina-*like* recombinante, expressa com a proteína de fusão MBP), echistatina (RGD), EC6 (heterodimérica) sobre a expressão de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) em fibroblastos humanos.

CAPÍTULO 1

OBTENÇÃO DE UMA DESINTEGRINA RECOMBINANTE DE *Agkistrodon contortrix laticinctus*

CAPÍTULO 1

O capítulo 1 desta dissertação descreve a otimização da expressão, purificação e clivagem de ACLD-C/MBP, uma proteína tipo desintegrina da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* com a seqüência adesiva DCD. ACLD-C teve sua expressão aumentada a partir de modificações no protocolo anteriormente estabelecido e pôde ser clivada de sua proteína de fusão quando o produto ACLD-C/MBP estava imobilizado em resina de amilose, pela qual a proteína MBP possui afinidade.

A seguir serão apresentados a metodologia, os resultados e as discussões referentes a estes experimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

A proteína tipo desintegrina ACLD-C foi subclonada a partir do clone da metalo/desintegrina ACLD (GenBank U86634) (Selistre-de-Araújo, Souza e Ownby, 1997). Para produção de ACLD-C recombinante foi desenvolvido em nosso laboratório um sistema de expressão heteróloga em bactérias, utilizando-se o vetor de expressão pMal-p (BioLabs, New England, USA) (figura 9). Este plasmídeo possibilita a expressão da ACLD-C na forma de fusão N-terminal com a proteína MBP (*maltose binding protein*), secretada no espaço periplásmico, permitindo que a purificação da proteína de interesse fusionada com a MBP seja realizada por cromatografia de afinidade através resina de amilose. O produto de subclonagem no vetor p-Mal-p foi denominado pMalD (IEMMA, Tese de doutorado 2002).

ACLD-C foi expressa em bactérias da linhagem BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen, Madison, WI, USA). A indução da expressão pelas bactérias foi feita pela adição de IPTG (Isopropil tio- β -D-galactopiranosídeo).

Para tentar evitar uma possível ação de proteases na degradação da proteína de interesse, foi testada a utilização de coquetel de inibidores de peptidases (SIGMA).

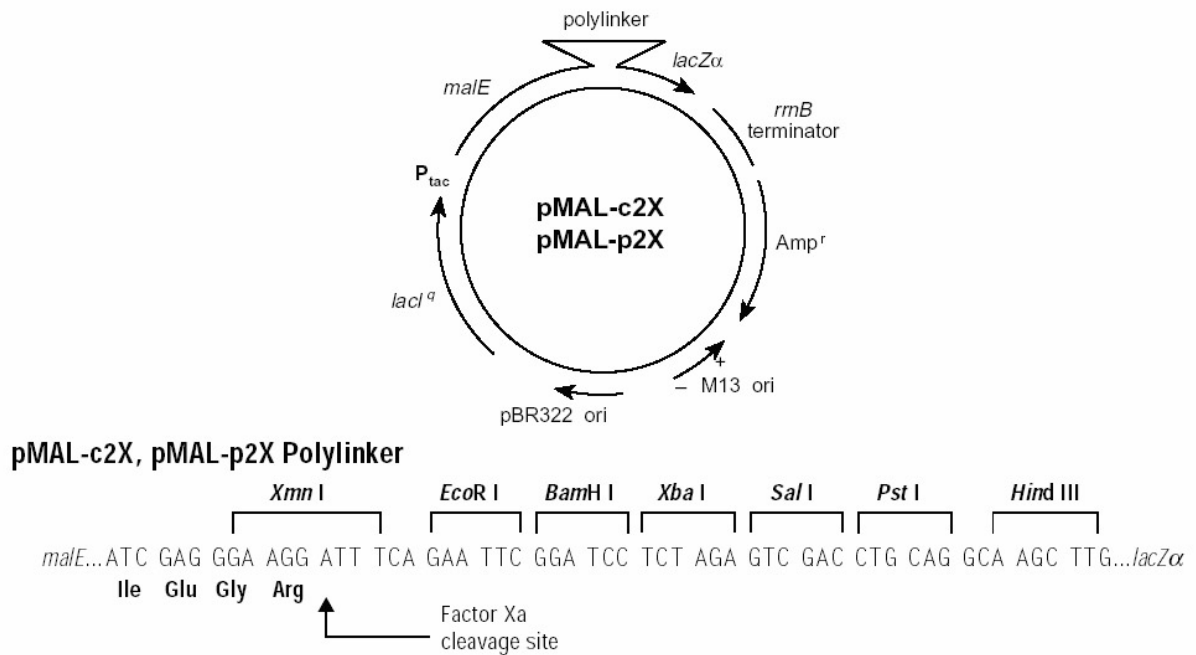


Figura 9 – Vetores de expressão pMal-2. pMal-p2x (6723 pares de bases), utilizado para a expressão da ACLD-C, inclui a seqüência sinal *malE*, responsável pelo endereçamento da MBP juntamente com a proteína de interesse para o espaço periplásmico. Extraído e modificado de *pMAL Protein Fusion and Purification System – Instruction Manual, version 5.01*.

Resinas Cromatográficas

Para a purificação da proteína recombinante foram utilizadas duas resinas cromatográficas: Resina de Amilose e Resina de filtração em gel Superdex-200 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Western blotting

A obtenção da MBP/ACLD-C e da ACLD-C após a clivagem com fator Xa foram confirmadas através de *Western blotting*, utilizando-se Membrana de nitrocelulose – Hybond™ -C (Amersham Life Science) e os anticorpos:

- Anti-Alternagina-C: origem policlonal, obtido pela imunização de camundongos com alternagina-C (Alt-C), uma proteína tipo desintegrina obtida do veneno de *Bothrops alternatus* (Souza *et al.*, 2000).
- Anti-MBP (Sigma Chemical Co. – St. Louis, MO, USA).

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

A revelação da reação com os anticorpos foi feita através do kit para revelação *Alkaline phosphatase conjugate substrate kit* (BioRad).

Padrões Moleculares de Proteína

Para as eletroforeses SDS-PAGE e *western blotting* foram utilizados os padrões moleculares de proteína Benchmark Protein Ladder - GibcoBRL® (proteína), Prestained Benchmark Protein Ladder (GibcoBRL® e BioRad) e padrões moleculares produzidos em nosso laboratório através da mistura de proteínas SIGMA.

Diálise

Antes de serem aplicadas nas colunas de cromatografia, as amostras foram dialisadas contra o tampão de equilíbrio da cromatografia a qual seriam submetidas.

Concentração protéica

Para a concentração protéica foi utilizado o sistema Centricon Plus 20 (10,000 NMWL), Millipore.

Quantificação protéica

A dosagem protéica foi obtida pelo uso do *kit* Bio-Rad Protein Assay (BioRad – Hercules, CA, USA) baseada no método de Bradford (Bradford, 1976).

Clivagem com o Fator Xa

A enzima Fator Xa (BioLabs, New England) foi utilizada para separação da proteína de fusão fusionada à proteína de interesse.

Outros reagentes

Todos os demais reagentes utilizados no presente trabalho possuíam grau de pureza analítico.

MÉTODOS

Ensaio de expressão (protocolo BioLabs)

Culturas de *E. coli* BL21(DE3) pMalD foram crescidas em meio LB seletivo com ampicilina (50 µg/ml) a 37 °C e 250rpm durante 16 horas. Após este período, o pré-inóculo foi diluído 1:40 em LB contendo ampicilina (50 µg/ml) e glicose (concentração final de 0,5%) e a cultura foi incubada a 37 °C sob agitação, até atingir a fase logarítmica de crescimento, identificada por uma $D.O_{.660nm} = 0.4 - 0.6$. Neste momento, foi retirada uma alíquota T0 (tempo antes da indução) de 1ml para verificação da expressão protéica basal. A amostra T0 foi centrifugada e ressuspensa em água estéril e tampão de amostra Tris-HCl 125mM, pH6.8, SDS (dodecil sulfato de sódio) 4% (m/v), glicerol 20%, 0,02% de azul de bromofenol (m/w) e β-mercaptoetanol 0,1M para eletroforese SDS-PAGE. A amostra foi então submetida a 100 °C por 5 minutos.

A cultura em fase log teve a expressão da ACLD-C induzida pela adição de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) em uma concentração final de 0,5mM, a 37 °C e 250rpm. Ampicilina (50mg/ml) foi novamente acrescentada no momento da indução. Após três horas de incubação, foi retirada uma nova alíquota T3 (três horas após a indução), que recebeu o mesmo tratamento de T0. O restante da cultura foi centrifugado por 10 minutos a 4000rpm e 4 °C, em uma centrífuga Sorvall RC 5C Plus, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensa em tampão de choque osmótico Tris-HCl 30mM pH 7,1 contendo 20% de sacarose (v/v), sendo logo em seguida adicionado EDTA 0,1M pH8,0. A suspensão foi incubada a temperatura ambiente sob suave agitação (50rpm) durante 10 minutos, e foi então centrifugada (15 minutos, 4000rpm, 4 °C). Uma alíquota (S1) do sobrenadante foi retirada e acrescentada de tampão de amostra, sendo também submetida a aquecimento a 100 °C por 5 minutos. O restante do sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensa em solução estéril gelada de MgSO₄ 5mM e mantido no gelo sob suave agitação por mais 10 minutos. A suspensão foi submetida a uma centrifugação a

13000rpm, 4 °C, 10 minutos, e foram retiradas alíquotas do precipitado (P), tratado como T0 e T3, e do sobrenadante após o choque osmótico (Sf), tratado como S1. Sf foi armazenado a -20 °C para a purificação da ACLD-C.

A expressão e solubilidade de ACLD-C recombinante foram analisadas em todas as alíquotas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Foi testada a utilização de um coquetel de inibidores de proteases (preparado de acordo com as especificações do fabricante) em diversas quantidades (50µl, 100µl e 250µl), acrescentadas após a indução de choque osmótico para evitar uma possível degradação da proteína de interesse.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE

A expressão da ACLD-C/MBP, assim como sua purificação e clivagem, foram acompanhadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE, Laemmli, 1970), utilizando-se o sistema Mighty Small II (Hoefer). As amostras foram aplicadas em um gel de empilhamento de 5% de poliacrilamida e gel de resolução de 15% e submetidas à eletroforese com corrente elétrica de 15 mA e voltagem até 125V, durante aproximadamente uma hora e meia. As bandas protéicas foram reveladas incubando-se os géis em solução corante contendo 0,25% de *Comassie Brilliant Blue R-250* (BioRad) dissolvidos em 50% isopropanol e 10% ácido acético, e solução descorante de 10% ácido acético e 10% de metanol.

O tampão de amostra consistiu de Tris-HCl (0,125 M pH6,8), dodecil sulfato de sódio (SDS – 4%), azul de bromofenol (0,025%), glicerol (20%) e o agente redutor β-mercaptoetanol (concentração final 0,1M).

A massa molecular aparente da proteína de interesse foi estimada utilizando-se padrões de massa molecular conhecidos, na faixa de 15-220kDa (*Benchmark Protein Ladder* – Gibco).

Purificação da ACLD-C/MBP

Após a confirmação da expressão e solubilidade da proteína recombinante ACLD-C, procedeu-se à etapa de purificação.

Cromatografia de Afinidade

O lisado celular (Sf) obtido do choque osmótico das células de *E. coli* BL21 (DE3) foi fracionado por cromatografia de afinidade em coluna de 1,3cm de diâmetro com 18ml resina de amilose (BioLabs) sob fluxo de 1ml/min, a 4 °C. A purificação se dá através da afinidade da MBP pelas unidades de amilose da resina. Desta forma, espera-se que a proteína recombinante permaneça retida na coluna enquanto as demais sejam removidas antes da aplicação do tampão de eluição por não possuírem afinidade pela amilose presente na resina.

A coluna foi previamente equilibrada com 3 volumes de tampão de equilíbrio (tampão A) Tris-HCl 20mM, 200mM de NaCl, pH 7,4. O sobrenadante final Sf da expressão, previamente dialisado contra o tampão A, foi então aplicado na coluna de amilose. Para a eluição das proteínas ligadas a resina foi utilizado o tampão B Tris-HCl 20mM com 200mM de NaCl e 10mM de maltose pH7,4. As frações foram coletadas com o auxílio de um coletor automático (Pharmacia) e registradas por um registrador (Pharmacia), sendo o tempo de coleta por fração definido em três minutos (3ml/fração). Alíquotas de frações não aderidas à resina (1º pico) e de frações eluídas (2º pico) foram analisadas em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.

Cromatografia de Gel-Filtração

As frações contendo ACLD-C/MBP obtidas da coluna de amilose foram concentradas para um volume final de 1,5ml em sistema de concentração Centricon Plus 20 (Millipore) através de centrifugação a 3.000 x g e temperatura de 4 °C. A amostra foi posteriormente dialisada contra tampão Tris-HCl 10mM adicionado de 100mM NaCl, pH 8,6, e então submetida a uma cromatografia de gel-filtração em coluna com resina Superdex-200 (80cm x 1,6cm) em fluxo de 1ml/min. As frações dos vários picos obtidos foram analisadas por SDS-PAGE e submetidas à reação de imunodeteção por *western blotting*.

Ensaio de imunodeteção

Para a confirmação da expressão de ACLD-C fusionada a MBP, as amostras foram submetidas a *western blotting* com os anticorpos anti-alternagina-C (produzido em nosso laboratório) e anti-MBP (SIGMA). As amostras foram aplicadas a eletroforese SDS-PAGE (15%) e transferidas para a membrana de nitrocelulose (Amersham Life Science),

através do sistema *TransBlot SemiDry* (BioRad), utilizando-se tampão de transferência Tris-HCl 48mM, Glicina 39mM, Metanol 20% pH 9.0, durante 1 hora a 15V. Para confirmar a transferência, a membrana foi corada com Ponceau 0,5% (m/v) em ácido acético 0,1% (v/v). As bandas de interesse foram marcadas e a membrana foi descorada em ácido acético 0,1% (v/v) e incubada em uma solução de bloqueio (leite 5%, Tween 20 0,5%, em TBS) por 1 hora sob leve agitação. Após este período, a membrana foi lavada com TBS (Tris-HCl 50mM, pH8,0; NaCl 0,24M) e incubada por 2 horas com os anticorpos primários anti-alternagina-C (1:5000) ou anti-MBP (1:4000), seguindo-se nova etapa de lavagem. Uma segunda incubação foi feita por mais duas horas com um segundo anticorpo, anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima fosfatase alcalina. Terminada a segunda incubação, a membrana foi submetida à última lavagem antes da revelação das bandas reconhecidas pelos anticorpos com o kit da BioRad, sendo a reação de revelação interrompida por lavagem da membrana com água destilada.

O ensaio de imunodeteção também foi realizado para confirmar a obtenção da ACLD-C após a clivagem, utilizando-se o anticorpo primário anti-Alt-C e secundário anti-IgG, conforme protocolo descrito para a imunodeteção da MBP/ACLD-C.

Dosagem de proteínas

A determinação da concentração protéica das amostras provenientes das cromatografias foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando-se o *kit* BioRad para determinação da concentração protéica (BioRad *protein assay*). A concentração protéica foi estimada através da comparação entre a leitura de absorbância à 595nm (espectrofotômetro da Amersham Biosciences) de uma curva padrão de BSA (Sigma) e a leitura das amostras, por análise através de regressão linear no programa de análise de curva Swift II.

Clivagem com o fator Xa

Após confirmação da produção da proteína de interesse, procedeu-se a etapa de clivagem para sua separação da MBP utilizando-se o fator de coagulação Xa. Esta enzima cliva preferencialmente após a seqüência de aminoácidos IEGR, que é inserida entre a seqüência da MBP e da proteína de interesse no vetor de expressão pMal (figura 9). As frações contendo o produto de fusão ACLD-C/MBP obtidas na cromatografia de filtração

foram concentradas para 1,5ml, dialisadas contra tampão PBS e misturadas com resina de amilose. Após adesão da MBP/ACLD-C à resina, foi adicionado o fator Xa. Foram testadas diferentes quantidades de fator Xa/quantidade de produto de fusão, períodos de clivagem (2h, 4h, 6h e 24h) e temperaturas de reação (temperatura ambiente e 37 °C). Após o período de clivagem, as reações foram centrifugadas por 5 minutos a 5000rpm e o sobrenadante foi coletado. A resina foi lavada com tampão B de cromatografia de afinidade em resina de amilose, centrifugada e o sobrenadante foi novamente coletado. Ambas as amostras foram analisadas em SDS-PAGE.

Documentação de Imagens

Para a documentação de imagens a partir de géis de poliacrilamida e das membranas de nitrocelulose (immunoblotting) foram utilizados o ScanJet Hewlet Packard e uma câmera digital Sony.

RESULTADOS

Ensaio de Expressão

Para o ensaio de expressão, amostras T0, T3, S1, Sf e P coletadas durante as diferentes etapas do processo de expressão foram analisadas por SDS-PAGE 15% (figura 10). Através do gel de poliacrilamida é possível verificar a expressão em nível basal de duas bandas protéicas de aproximadamente 70kDa compatível com o produto de fusão MBP/ACLD-C antes da indução por IPTG (T0) (figura 10, coluna 2) e sua superprodução após a indução (T3) (figura 10, coluna 3). A massa molecular esperada de aproximadamente 70kDa se deve à soma da massa de cada uma das proteínas, sendo ACLD-C com aproximadamente 25kDa e MBP com 45kDa.

É possível observar que já em S1 há liberação de parte da proteína de interesse (figura 10, coluna 4). Entretanto, a maior parte de MBP/ACLD-C é obtida após o choque osmótico, visualizado em Sf (figura 10, coluna 5). Em P (figura 10, coluna 6) ainda resta uma pequena parte do produto de fusão, que poderia ser recuperado através de nova ressuspensão em solução de $MgSO_4$ 5mM para purificação.

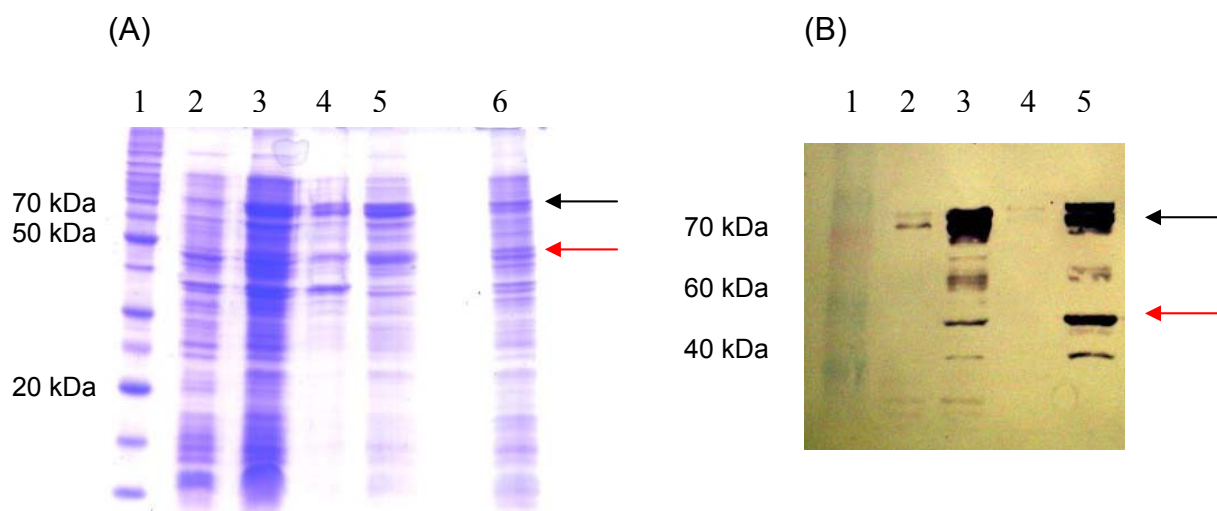


Figura 10 – Ensaio de expressão de MBP/ACLD-C. (A) SDS-PAGE 15%: 1) Padrão de massa molecular (Gibco); 2) T0; 3) T3; 4) S1; 5) Sf; 6) Ppt. (B) Imunodeteccção com anticorpo anti-MBP: 1) padrão de massa molecular pré-corado (Gibco); 2) T0; 3) T3; 4) S1; 5) Sf. Flecha preta: MBP/ACLD-C (~70kDa); flecha vermelha: MBP (~45kDa).

O produto de fusão apresentou-se em duas bandas próximas a 70kDa, o que poderia indicar degradação por peptidases bacterianas. Dessa forma, um ensaio de expressão utilizando-se um coquetel de inibidores de peptidases logo após indução de choque osmótico

por MgSO_4 5mM foi realizado. Entretanto, é possível verificar que os inibidores não impediram o aparecimento das duas bandas protéicas próximas a 70kDa em nenhuma das concentrações testadas (figura 11, colunas 8, 9, 10, 11), o que poderia indicar a ineficácia do coquetel ou que as bandas não são produto de degradação proteolítica.

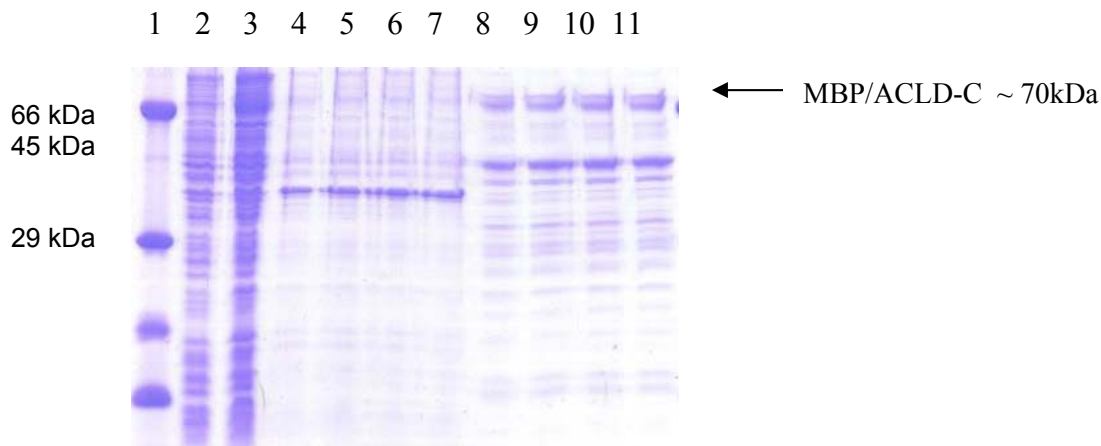


Figura 11 – Ensaio de expressão utilizando coquetel inibidor de peptidases. SDS-PAGE 15%: 1) Padrão de massa molecular (proteínas Sigma); 2) T0; 3) T3; 4) S1a (250ml de cultura sem coquetel); 5) S1b (1ml coquetel/250ml de cultura); 6) S1c (2ml coquetel/250ml de cultura); 7) S1d (5ml coquetel/250ml de cultura); 8) Sfa; 9) Sfb; 10) Sfc; 11) Sfd.

Purificação do produto de fusão MBP/ACLD-C

Cromatografia de afinidade

O material Sf obtido do choque osmótico das células induzidas foi dialisado e depois fracionado em coluna de amilose por cromatografia de afinidade devido ao fato do produto de fusão ter afinidade por unidades de maltose. Na figura 12 está representado o perfil cromatográfico da proteína de fusão MBP/ACLD-C. A análise por SDS-PAGE 15% das frações obtidas dos dois picos mostram que MBP/ACLD-C não é obtida pura após eluição, sendo que a maioria dos contaminantes é composta por MBP não fusionada (Figura 13).

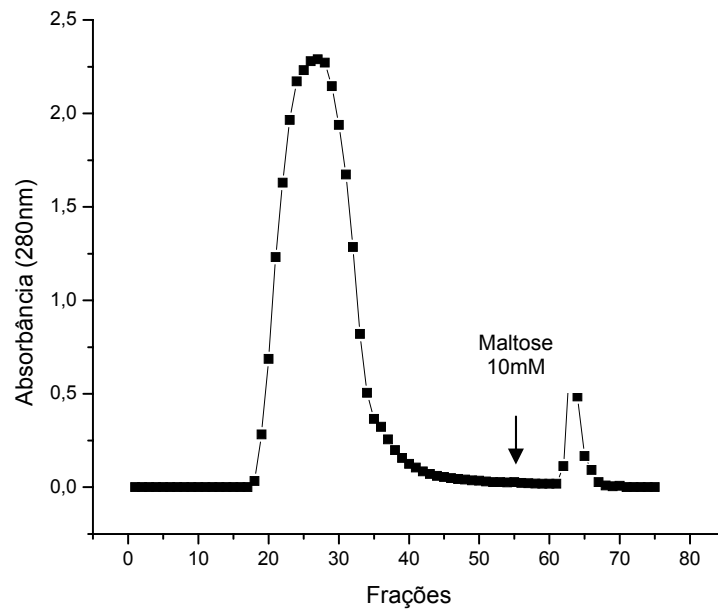


Figura 12 – Cromatografia de afinidade. Perfil cromatográfico das amostras obtidas pelo fracionamento de Sf em resina de amilose.

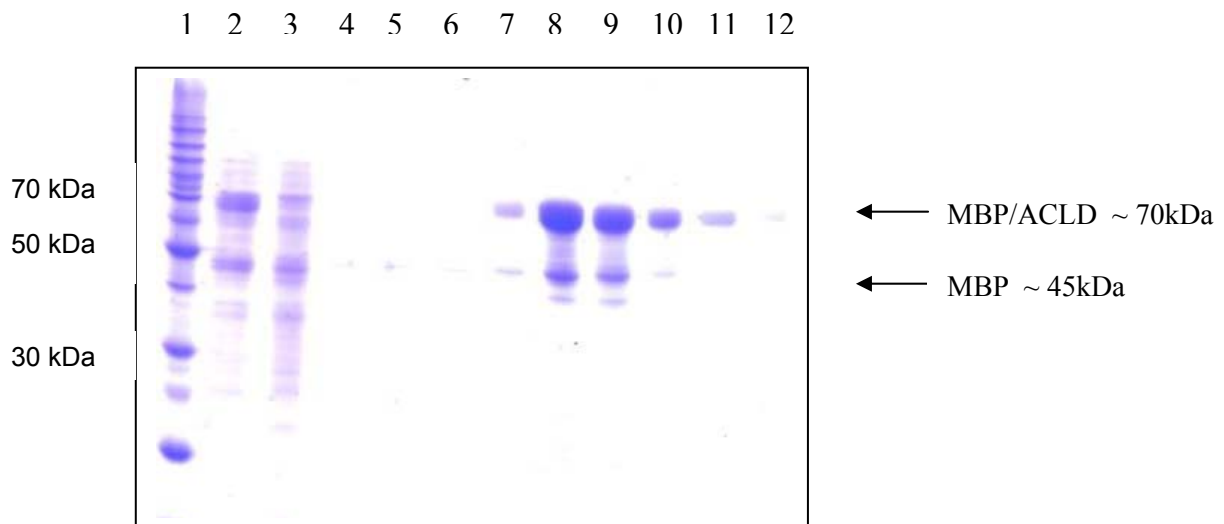


Figura 13 – Análise em SDS-PAGE 15% das frações obtidas em cromatografia de afinidade em resina de amilose a partir da aplicação de Sf. 1) Padrão de massa molecular (Gibco); 2) Sf; 3) fração não aderida a resina (primeiro pico); 4) a 12) frações eluídas após aplicação de tampão com maltose (segundo pico).

Cromatografia de gel-filtração

As frações eluídas com maltose da coluna de amilose foram concentradas para um volume final de aproximadamente 1,5ml. A amostra foi dialisada e submetida ao novo fracionamento em coluna de filtração molecular. Na figura 14 está representado o perfil cromatográfico da proteína de fusão MBP/ACLD-C e na figura 15 está a análise por SDS-PAGE. Pode-se observar que a proteína foi obtida pura nos primeiros picos eluídos, de acordo com o esperado por seu tamanho maior que seus contaminantes.

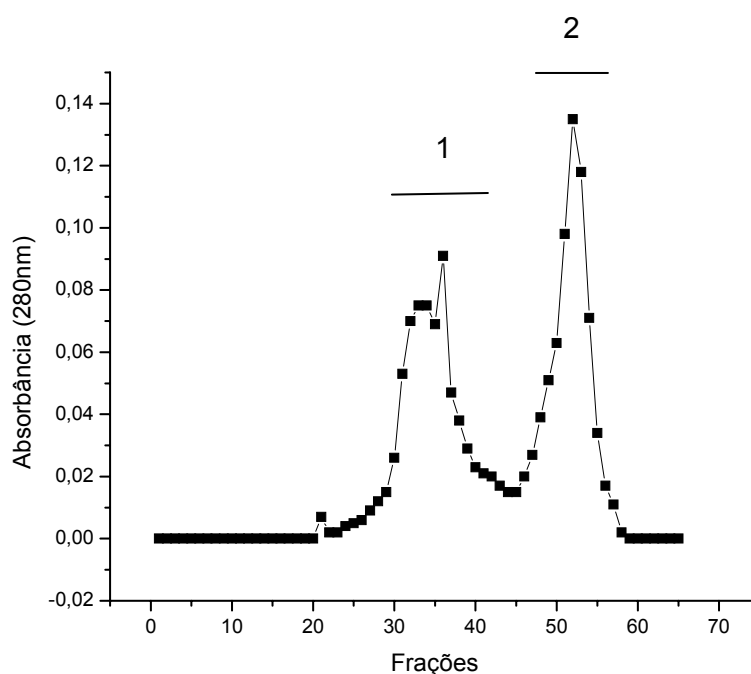


Figura 14 – Cromatografia de gel-filtração. Perfil cromatográfico das frações obtidas pelo fracionamento das amostras eluídas na cromatografia de afinidade aplicada a cromatografia de gel-filtração.

As frações correspondentes a MBP/ACLD-C pura foram reunidas e concentradas, a concentração da proteína foi dosada pelo método de Bradford. O rendimento final foi de 1,2mg/L de cultura, a partir de 9,5mg/L de cultura do total de proteínas no espaço periplásmico (Sf).

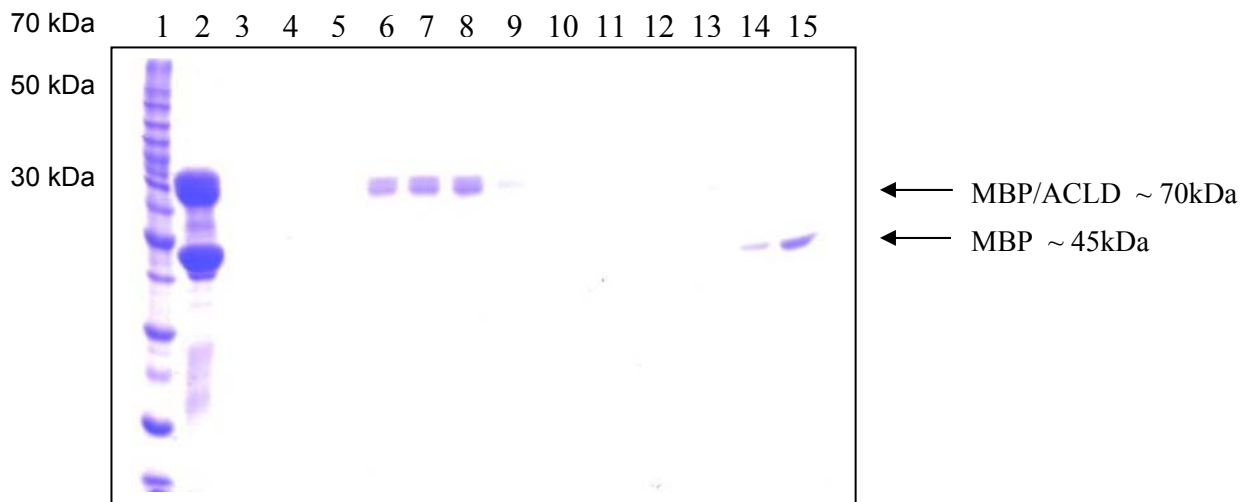


Figura 15 – Análise em SDS-PAGE 15% das frações obtidas em cromatografia de gel-filtração a partir da aplicação das frações eluídas no segundo pico da cromatografia de afinidade. 1) Padrão de massa molecular (Gibco); 2) Amostra aplicada na coluna Superdex-200; 3) a 11) frações relativas ao primeiro pico; 12) a 15) frações referentes ao segundo pico.

Ensaio de clivagem com fator Xa

Para obter ACLD-C recombinante sem a MBP, foram realizados ensaios de clivagem com enzima fator Xa de coagulação. O produto de fusão MBP/ACLD-C foi dialisado contra tampão PBS e então submetido à clivagem sob diferentes condições de concentração de FXa, período e temperatura de incubação. Na figura 16A pode-se observar a obtenção de duas bandas protéicas próximas a 25kDa, massa esperada para a ACLD-C, após a clivagem, sendo que as melhores condições para a reação seriam sob temperatura ambiente, 1µg FXa/6µg de MBP/ACLD-C e 2 horas. As outras bandas presentes são relativas ao fator Xa, que sob condições redutoras aparecem como duas bandas.

A obtenção da ACLD-C após a clivagem foi confirmada após a reação positiva da reação de clivagem com o anticorpo anti-Alternagina-C (figura 16B).

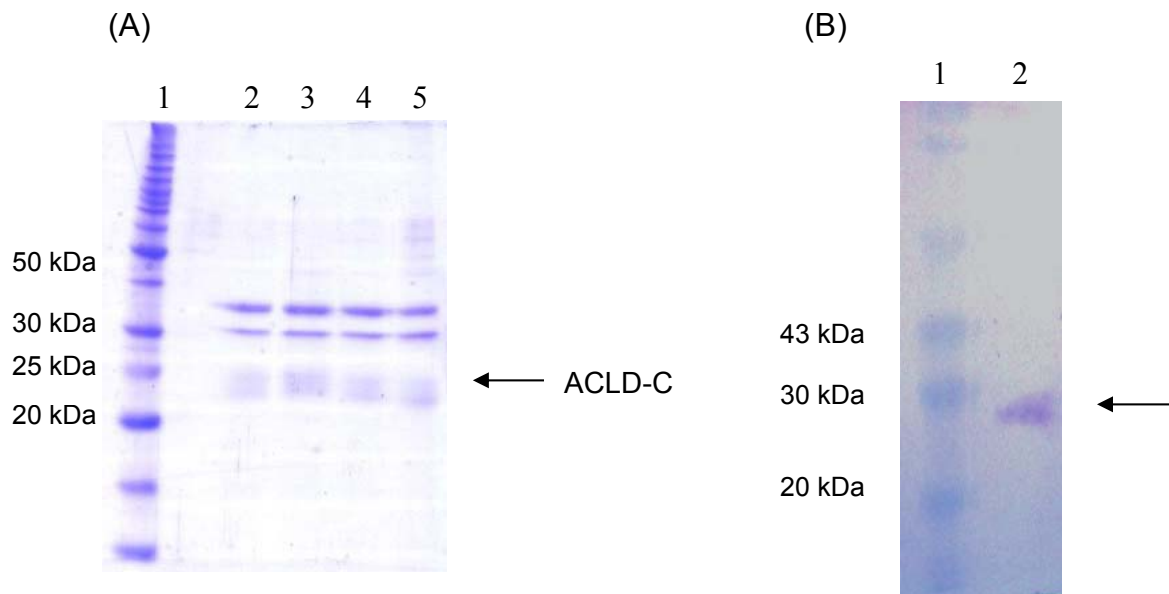


Figura 16 – Ensaio de clivagem da MBP/ACLD-C com fator Xa a temperatura ambiente. (A) SDS-PAGE 15%: 1) Padrão de massa molecular (Gibco); 2) após 2h de incubação com a enzima; 3) após 4h; 4) após 6h; 5) após 24h. (B) Imunodeteccção com anticorpo anti-ALT-C: 1) padrão de massa molecular pré-corado (BioRad); 2) Reação de clivagem após 2h.

DISCUSSÃO

As proteínas recombinantes são requeridas em pesquisas biológicas para investigar atividade enzimática, interação com ligantes, interações protéicas, entre outras funções, além de muitas serem potenciais alvos farmacêuticos. Entre estas proteínas estão as desintegrinas encontradas em venenos de serpentes, bastante utilizadas em estudos de adesão celular por interagirem com as integrinas, receptores envolvidos em processos de adesão.

O isolamento e a caracterização de desintegrinas nativas dos venenos podem apresentar dificuldades de obtenção em grandes quantidades para uso em estudos em ensaios biológicos e processos de cristalização e resolução de estruturas. Dessa forma, a técnica do DNA recombinante, descoberta por volta de 1970, representa uma boa alternativa para obtenção destas proteínas, pois possibilita clonar e produzir proteínas recombinantes de forma mais rápida, com maior rendimento e qualidade mais constante quando comparada com a obtenção a partir de veneno bruto.

O presente trabalho descreve a otimização da expressão e purificação do produto de fusão MBP/ACLD-C, e a clivagem para obtenção da ACLD-C livre da MBP.

ACLD-C é uma proteína desintegrina-like, ou tipo desintegrina, do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*, que possui o domínio desintegrina-like com a seqüência adesiva DCD (no lugar de RGD encontrada na maioria das desintegrinas) e o domínio rico em cisteína. Ela foi subclonada a partir do clone da ACLD (GenBank U86634), uma metalopeptidase cuja seqüência protéica predita a partir do cDNA apresenta alta homologia com SVMPs de classe PIII como a jararagina (69,35% de identidade) de *Bothrops jararaca* (PAINE *et al.*, 1992) e catrocollastatina (70,77% de identidade) de *C. atrox* (ZHOU *et al.*, 1995) (Selistre-de-Araújo, Souza e Ownby, 1997). Assim, ACLD-C seria o produto do processamento da ACLD, como ocorre com as desintegrinas-like alternagina-C (SOUZA *et al.*, 2000), jararagina-C (USAMI *et al.*, 1994) e catrocollastatina-C (SHIMOKAWA *et al.*, 1997), que possuem a seqüência adesiva ECD.

ACLD-C recombinante foi produzida em *E. coli*, que constitui um sistema de expressão com diversas vantagens, como facilidade de uso, altas taxas de crescimento e produção, baixo custo e disponibilidade. A linhagem utilizada foi BL21(DE3) de *E. coli* F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) (Novagen, Madison, WI, USA). Tais células possuem o gene que codifica para a T7 RNA polimerase e carecem das proteases *OmpT* e *LonI*, favorecendo a super-expressão das proteínas heterólogas. O indutor, IPTG, desreprime a transcrição da T7 RNA polimerase a partir do DNA genômico, aumentando a produção da

enzima, a qual atua no plasmídeo de expressão (com velocidade superior a da polimerase bacteriana), transcrevendo grandes quantidades de mRNA relativo à proteína recombinante de interesse em fusão com o peptídeo que facilitará sua purificação.

O vetor de expressão utilizado, plasmídeo pMal-p (BioLabs, New England, USA), possibilita a expressão da proteína-alvo na forma de fusão N-terminal com a proteína MBP (*maltose-binding protein*). Muitas aplicações diferentes para as proteínas de fusão em diferentes áreas da biotecnologia têm sido descritas (NILSSON *et al.*, 1992; KOCKNEY, 1994; LAVALLIE & McCOY, 1995), incluindo aumento de solubilidade e facilidade de purificação. A MBP, produto do gene *malE*, é uma proteína altamente solúvel (BEDOUELLE & DUPLAY, 1988; di GUAN *et al.*, 1988), possibilitando que a proteína-alvo fusionada a ela também seja expressa na forma solúvel. De fato, o produto MBP/ACLD-C foi expresso de forma solúvel, com a massa molecular esperada de aproximadamente 70kDa, sendo cerca de 25kDa devida a ACLD-C. A expressão da MBP/ACLD-C foi analisada em gel de poliacrilamida e confirmada através de imunodeteção com anticorpos primários anti-MBP e anti-alternagina-C, uma desintegrina-like de *Bothrops alternatus* (SOUZA *et al.*, 2000).

A MBP é exportada para o espaço periplásmico devido a uma seqüência sinal, ligando-se especificamente com alta afinidade a maltose ou maltodextrinas presentes no local para o subsequente transporte desses açúcares através da membrana citoplasmática (DUPLAY *et al.*, 1984). Esta propriedade é utilizada para facilitar a purificação da proteína-alvo recombinante fusionada a MBP. Assim, ACLD-C/MBP foi parcialmente purificada por cromatografia de afinidade em resinas contendo amilose ligada, seguida por eluição competitiva com maltose (KELLREMAN & FERENCI, 1982). Porém a proteína de interesse não foi completamente purificada, visto que *E. coli* expressou também MBP não fusionada observada em gel de poliacrilamida, que aderiu a resina de amilose juntamente com MBP/ACLD-C. Dessa forma, as frações eluídas com maltose foram concentradas e submetidas à cromatografia de gel-filtração em resina Superdex-200, sendo obtida MBP/ACLD-C pura.

O rendimento final da MBP/ACLD-C foi de 1,2mg/L de cultura, o que representa 12,6% do total de proteínas expressas presentes no espaço periplásmico de *E. coli*, estimado em 9,5mg/L de cultura. O rendimento obtido superou em 200% o rendimento obtido anteriormente, que foi de 0,4mg/L de cultura.

Para separar a ACLD-C da MBP, seguiu-se uma etapa de clivagem com a peptidase fator Xa. O vetor utilizado foi desenvolvido com introdução de uma seqüência de reconhecimento -IEGR- (clivada após o último aminoácido do tetrapeptídeo) para fator Xa no

C-terminal de MBP a fim de permitir a liberação de uma proteína-alvo fusionada a MBP (MINA *et al.*, 1988). O requerimento do uso de fator Xa para clivar a proteína alvo fusionada a MBP é citado como uma desvantagem deste sistema de expressão, pois se trata de uma peptidase relativamente cara e com requerimentos estéricos para a ligação ao sítio de clivagem que freqüentemente resulta na clivagem muito lenta ou incompleta (RIGGS, 1992; LIGER *et al.*, 1995). No caso da clivagem da MBP/ACLD-C obteve-se a proteína recombinante de interesse conforme a proposição do sistema de expressão. A clivagem foi realizada com o produto de fusão imobilizado na resina de amilose, pois a clivagem em solução resultava na perda da ACLD-C (resultados não mostrados). Após a clivagem, a análise em gel de poliacrilamida mostra uma banda de aproximadamente 24kDa, supostamente referente a ACLD-C, o que foi confirmado após reação de imunodeteção com o anticorpo primário anti-alternagina-C.

O produto MBP/ACLD-C foi expresso na forma ativa, o que foi confirmado anteriormente à otimização da sua produção, através de ensaios em que ela inibiu a adesão de $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I de maneira dose-dependente comparando-se com a utilização de MBP não fusionada, que não apresentou atividade (IEMMA, tese de doutorado, 2002). Ensaios de indução de expressão de VEGF por fibroblastos humanos comprovando a atividade da proteína recombinante também são mostrados no capítulo 2 desta dissertação. O enovelamento correto das proteínas recombinantes expressas neste sistema de expressão é facilitado pelo fato de MBP não conter resíduos de cisteína que pudessem interferir com a formação de pontes dissulfeto dentro da proteína de fusão.

Outras desintegrinas de veneno de serpente foram expressas como produtos de fusão na forma ativa. CHANG *et al.* (1993) clonaram e expressaram em *E. coli* a rhodostomina (kistrina), uma desintegrina-RGD do veneno de *Calloselasma rhodostoma* (HUANG *et al.*, 1987) fusionada a proteína de fusão GST (glutathione-transferase) e verificou-se que o produto de fusão GST-rhodostomina (rendimento = 10-30% do total de proteínas da célula) foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por trombina em solução (CHANG *et al.*, 1993), efeito anteriormente verificado com a desintegrina nativa (TENG & HUANG, 1991a; 1991b). GST-rhodostomina também foi capaz de agir como substrato adesivo para plaquetas e para sua difusão (CHANG & LO, 1998), e posteriormente, observou-se ainda o decréscimo da fosforilação da FAK em plaquetas (CHANG *et al.*, 1999), indicando que GST-rhodostomina foi um substrato mais eficiente para a ativação plaquetária do que o fibrinogênio, ligante natural dessas células. A partir destes resultados, CHANG *et al.* (1997) sugeriram que o produto de fusão GST-rhodostomina poderia ser potencialmente usado para

análises minuciosas de mecanismos moleculares dos processos cinéticos de ativação plaquetária.

Contortostatina (CN), uma desintegrina homodimérica de *Agkistrodon contortrix contortrix* (TRIKHA *et al.*, 1994) também foi obtida a partir de clonagem, na qual o gene da desintegrina foi descoberto como parte de um precursor composto de uma pró-proteína, domínio metalopeptidase e domínio desintegrina, evidenciando que ela pode ser originada do processamento proteolítico pós-traducional de uma SVMP da classe PII, conforme sugeriram KINI & EVANS (1992). CN recombinante foi expressa fusionada a uma imunoglobulina em células NS0 de mieloma murino, e o produto de fusão chTNT-3 (rendimento = 28mg/L cultura) foi capaz de bloquear a agregação plaquetária e a invasão e adesão de células tumorais, além de exibir especificidade de ligação as integrinas $\alpha_V\beta_3$ e $\alpha_V\beta_5$, assim como a desintegrina nativa (TRIKHA *et al.*, 1994). Assim, o sucesso da expressão funcional não somente valida a clonagem de cDNA desta desintegrinas, como também fornece material adequado para estudos funcionais da CN, que pode contribuir para o estudo da inibição da invasão de células tumorais.

Eristostatina, uma desintegrina-RGD isolada do veneno de *Eristocophis macmahoni*, é um ligante seletivo da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, inibindo fortemente a agregação plaquetária através da interação com essa integrina (McLANE *et al.*, 1994). BUTERA *et al.* (2003) clonaram e expressaram eristostatina em fusão a extremidade N-terminal de uma variante da fosfatase alcalina de *E. coli* (MULLER *et al.*, 2001). A proteína quimérica Er/APv (rendimento = 2mg/L cultura) foi expressa na fração periplásmica da bactéria e mostrou atividade conservada para as duas proteínas: a atividade catalítica do produto de fusão foi similar a de APv e a desintegrina, Er, mostrou seletividade para a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, reagindo fracamente com $\alpha_1\beta_5$ e $\alpha_V\beta_3$, confirmando resultados prévios com Er nativa (WIERZBICKA-PATYNOWSKI, *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem fortemente que a fusão a APv e a dimerização não alteraram a seletividade de Er, que, por sua vez, também não interferiu no enovelamento e atividade de APv. Dessa forma, produto de fusão Er/APv se mostrou um marcador seletivo capaz que discriminar populações de células $\alpha_{IIb}\beta_3$, indicando que as desintegrinas podem ser produzidas para a construção de marcadores seletivos de integrinas.

Uma nova desintegrina-RGD de *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger*, denominada adinbitor, foi clonada e expressa na forma solúvel em *E. coli* fusionada a uma cauda de polihistidina (*His tag*) (WANG *et al.*, 2004). rAdinbitor inibiu a agregação

plaquetária induzida por ADP. A desintegrina recombinante também demonstrou capacidade de inibição da angiogênese *in vitro* e *in vivo*, através da ligação a $\alpha_v\beta_3$, podendo ser de grande utilidade no estudo anti-tumoral, além de estudos anti-trombóticos.

A obtenção de desintegrinas que foram separadas de sua proteína de fusão também é descrita. O domínio desintegrina-*like* adicionado do domínio rico em cisteína da SVMP bothropasina (MANDELBAUM *et al.*, 1982) foi clonado e expresso fusionado a GST, GST-BDC, da qual foi separado por clivagem com trombina. BDC (rendimento = 1mg/L cultura) inibiu a agregação plaquetária de maneira dose-dependente com eficiência de aproximadamente cinco vezes maior que a bothropasina nativa (ASSAKURA *et al.*, 2003).

Jararagina-C, uma desintegrina-*like* de *Bothrops jararaca* (USAMI *et al.*, 1994) foi produzida na forma solúvel em bactérias *E. coli* fusionada a tiorredoxina (MOURA-SILVA *et al.*, 1999). Diferente dos casos citados acima, o produto de fusão da expressão de jararagina-C com tiorredoxina, Trx-JD9 (rendimento = 20-50mg/L cultura), não apresentou atividade comparada à proteína nativa. Contrariamente, JD9 separada da Trx mostrou-se ativa, inibindo a agregação plaquetária de maneira dose-dependente. Entretanto, a atividade foi inferior a da jararagina-C nativa, sugerindo-se que apenas uma pequena parte das moléculas expressas foi corretamente enovelada, o que foi confirmado após fracionamento da Trx-JD9 clivada obtendo-se uma pequena fração de JD9 (0,85 μ g/L cultura) com atividade similar a da jararagina-C nativa.

Uma nova desintegrina-*like* DECD de *Glodius halys*, denominada halydina, foi clonada e expressa com sucesso em *Pichia pastoris* (YOU *et al.*, 2003). Halydina recombinante foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno. A atividade exercida por halydina se deu através da integrina $\alpha_2\beta_1$, em contraste com a inibição da agregação plaquetária por ligação a $\alpha_{IIb}\beta_3$, observada em desintegrinas-RGD. O mecanismo funcional do domínio desintegrina-*like* na inibição da agregação plaquetária ainda não é completamente compreendido. Assim, halydina se mostra potencialmente importante para o aprofundamento da compreensão deste processo.

As desintegrinas são proteínas com número relativamente alto de cisteínas que se reúnem para formar pontes dissulfeto, o que pode representar uma dificuldade na expressão de proteínas ativas. Entretanto, os dados citados acima mostram as desintegrinas recombinantes podem ser expressas com enovelamento correto, visto que mesmo aquelas testadas como produto de fusão apresentaram atividades bastante satisfatórias. As atividades exibidas pelas desintegrinas com a proteína de fusão podem confirmar que a engenharia

genética permite a construção de genes de fusão resultando em produtos com as propriedades combinadas dos produtos do gene original. Dessa forma, as desintegrinas recombinantes, incluindo-se a ACLD-C, apresentam-se instrumentos promissores para o estudo de diversos processos biológicos normais e patológicos mediados pela adesão, podendo ser utilizadas como modelos para diagnóstico e desenvolvimento de terapias para doenças como câncer.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DOS EFEITOS DE DESINTEGRINAS NA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO DE ENDOTÉLIO VASCULAR

CAPÍTULO 2

Experimentos de expressão gênica de fibroblastos humanos influenciada por ALT-C, uma proteína tipo desintegrina de *Bothrops alternatus*, purificada e caracterizada em nosso laboratório, despertaram interesse quanto à especificidade das desintegrinas na modificação da expressão de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), uma citocina envolvida na proliferação de células endoteliais e na grande maioria das desordens angiogênicas descritas. Cominetti *et al.* (2004) demonstraram que ALT-C é capaz de estimular a proliferação em células HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), além de estimular a angiogênese *in vivo* de forma dose-dependente (resultados não publicados), o que poderia ser explicado pela indução da expressão de VEGF por essa desintegrina.

Assim, resolveu-se investigar a ação de outras desintegrinas sobre a expressão deste fator de crescimento em fibroblastos, utilizando-se para o estudo a ACLD-C (proteína tipo desintegrina recombinante, expressa com a proteína de fusão MBP), a echistatina (desintegrina-RGD) e a EC6 (desintegrina heterodimérica).

Este capítulo apresenta a metodologia, os resultados e as discussões referentes a estes experimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Proteínas

As desintegrinas Echistatin e EC6, ambas da serpente *Echis carinatus* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Stefan Niewiarowski (*in memoriam*) Temple University, Filadélfia, PA, EUA e ACLD-C/MBP (*Agkistrodon contortrix laticinctus*) foi obtida por expressão heteróloga em bactérias e purificação em nosso laboratório (procedimentos descritos no capítulo 1 desta dissertação)

Linhagens celulares

Os fibroblastos humanos (Clonetics, San Diego, CA, USA) foram gentilmente fornecidos pelo prof. Jay W. Fox (University of Virginia Health System, Charlottesville, VA, USA).

Cultura Celular

Para o cultivo dos fibroblastos foram utilizados:

- Meio DMEM
- Soro fetal bovino (FBS) e os antibióticos penicilina e estreptomicina foram obtidos da Cultilab (Campinas, SP).
- O antifúngico anfotericina-B foi obtido da Gibco (Carlsbad, CA, USA).

Kit VEGF

A expressão de VEGF pelos fibroblastos foi verificada através do *kit Quantikine immunoassay for human VEGF* (R & D Systems).

Todos os demais reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico.

Documentação de Imagens

Para a captura e documentação de imagens das células foram utilizados um microscópio de contraste de fase Olympus, uma câmera Olympus e o software Image Pro-plus.

MÉTODOS

Manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media* – Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 10mM de L-glutamina

(Sigma), 2,5µg de anfotericina-B (Gibco) e 10ml da mistura de penicilina-estreptomicina (Gibco) a 37 °C, em estufa com 5% de CO₂.

Ensaio de expressão de VEGF através de ELISA (conforme Cominetti et al., 2004)

Fibroblastos humanos em uma concentração de 80% da confluência máxima (aproximadamente 2×10^6 células/ml) em meio DMEM contendo 10% de FBS, previamente incubados ou não por 30 minutos com as desintegrinas (400nM) foram adicionados a placas de Petri (Corning) (6cm de diâmetro) tratadas para cultura celular diretamente sobre o plástico, as quais foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ durante 4h, 24h ou 48h. A viabilidade celular foi determinada através do corante *Trypan Blue* (Gibco). Após o término de cada período de incubação, o meio de cultura (meio condicionado) de cada placa foi aspirado e mantido a – 80 °C. As células não tratadas com nenhuma desintegrina foram utilizadas como controle negativo nos experimentos. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Para verificar a expressão de VEGF no nível protéico, utilizou-se o *kit Quantikine immunoassay for human VEGF* (R & D Systems), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, 200µl do meio condicionado de cada tempo de incubação testado, além do controle, foram adicionados em cada poço da placa, previamente coberto com um anticorpo monoclonal anti-VEGF humano. Após 2h de incubação em temperatura ambiente, os poços foram lavados e um anticorpo policlonal anti-VEGF humano ligado a uma enzima foi adicionado a cada poço. Após outra lavagem, uma solução contendo o substrato para a enzima conjugada com o anticorpo policlonal foi adicionado aos poços e o desenvolvimento da cor ocorreu em proporção à quantidade de VEGF presente no poço. A absorbância foi registrada em um leitor de placa (Dynex) com filtro de 450nm.

Análise estatística

Os ensaios foram analisados quanto à sua significância estatística. O experimento foi realizado em duplicata e a média e o erro padrão da média para cada experimento foi determinado. Para a comparação entre as amostras das células tratadas e com as não tratadas (grupo controle), o método de Bonferroni foi utilizado. Os níveis aceitáveis de p foram * (p<0,05), ** (p<0,01) e *** (p<0,001).

RESULTADOS

Para investigar o efeito de diferentes desintegrinas sobre a expressão de VEGF, três diferentes desintegrinas, MBP/ACLD-C (desintegrina-*like* recombinante, expressa com a proteína de fusão MBP), echistatina (desintegrina-RGD) e EC6 (desintegrina heterodimérica) foram incubadas com fibroblastos humanos e o meio condicionado foi coletado e submetido ao ensaio de ELISA, utilizando-se o kit para detecção de VEGF (kit R&D Systems).

MBP/ACLD-C

A desintegrina recombinante com sua proteína de fusão MBP (*maltose binding protein*) foi capaz de estimular fortemente a produção de VEGF nos fibroblastos em 4h de incubação em relação ao controle (considerado 100%) (Figura 17). O nível da citocina então declinou, chegando a valores mais baixos que o do controle, e voltando a aumentar até 48h, superando novamente o controle.

As imagens das células incubadas com a desintegrina recombinante indicam que não houve alteração da morfologia celular (Figuras 18 e 19).

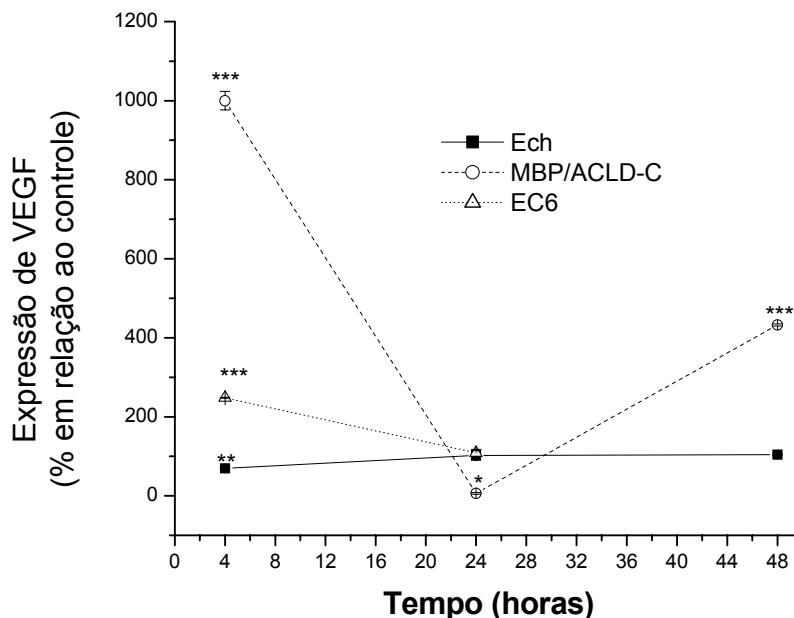
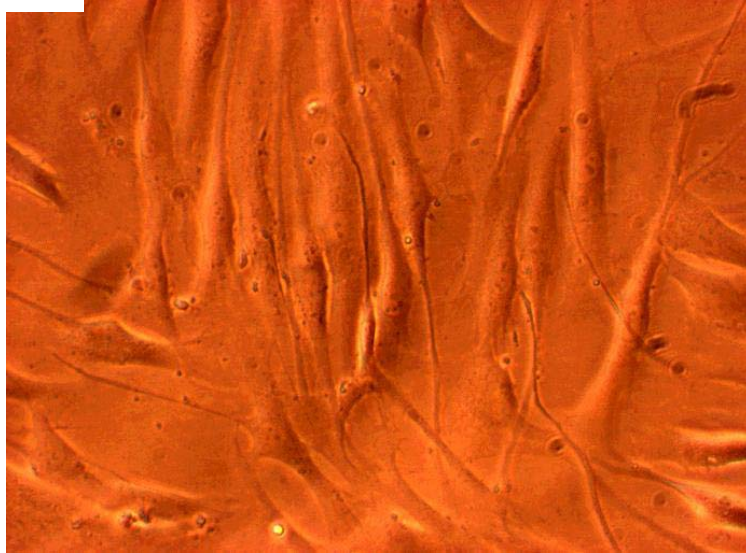


Figura 17 – Nível de expressão de VEGF em fibroblastos incubados com MBP/ACLD-C, echistatina e EC6 solúveis. Controle = 100%. Análise estatística: foi utilizado o método de Bonferroni para a comparação dos valores obtidos de cada tempo (entre Controle e células tratadas com as desintegrinas). Não foi possível realizar a análise estatística para EC6 e seu controle, que possuía somente 1 valor (tempo 24h).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

(A)



(B)

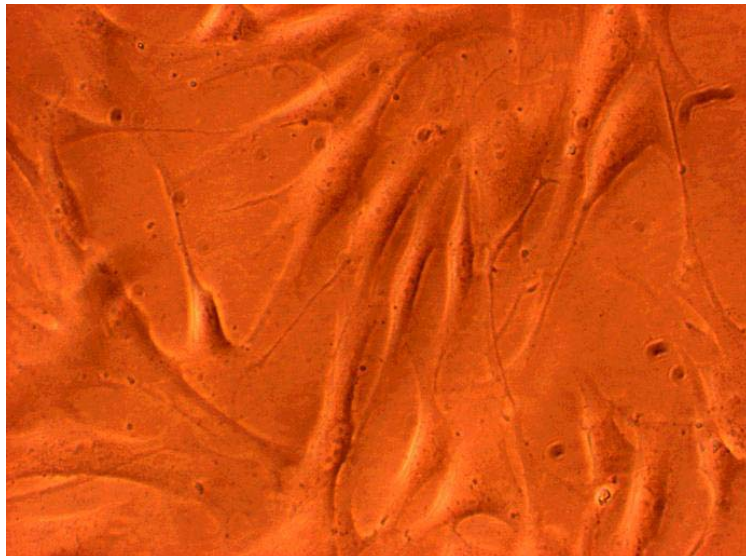
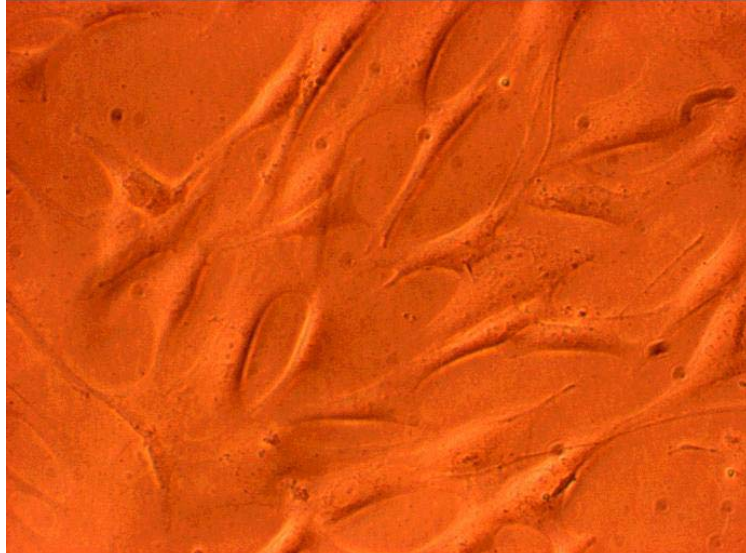


Figura 18 – Imagens de fibroblastos humanos tratados com MBP/ACLD-C após 24h. (A) Controle: células não tratadas; (B) células incubadas com a desintegrina.

(A)



(B)

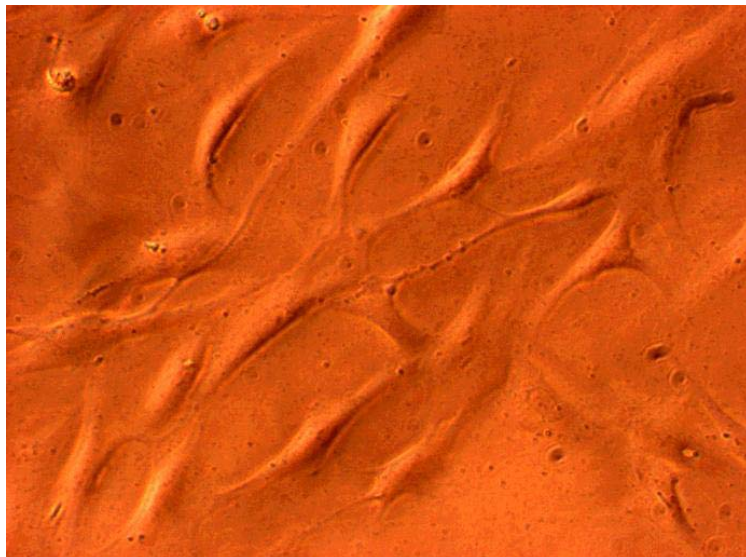


Figura 19 – Imagens de fibroblastos humanos tratados com MBP/ACLD-C após 48h. (A) Controle: células não tratadas; (B) células incubadas com a desintegrina.

Echistatina

Os resultados obtidos para os fibroblastos tratados com echistatina (figura 17) indicam que o nível de VEGF não aumentou em relação ao controle. Em 4 h, a expressão de VEGF é mais baixa em relação às células não tratadas. O nível de VEGF entre 4h e 24h horas aumenta, chegando ao mesmo nível do controle, e é mantido constante até 48h.

Na figura 20 observa-se que as células tratadas com echistatina adquirem morfologia diferenciada em relação às células do controle em 48h, indicando possível morte celular pelo tratamento com a desintegrina.

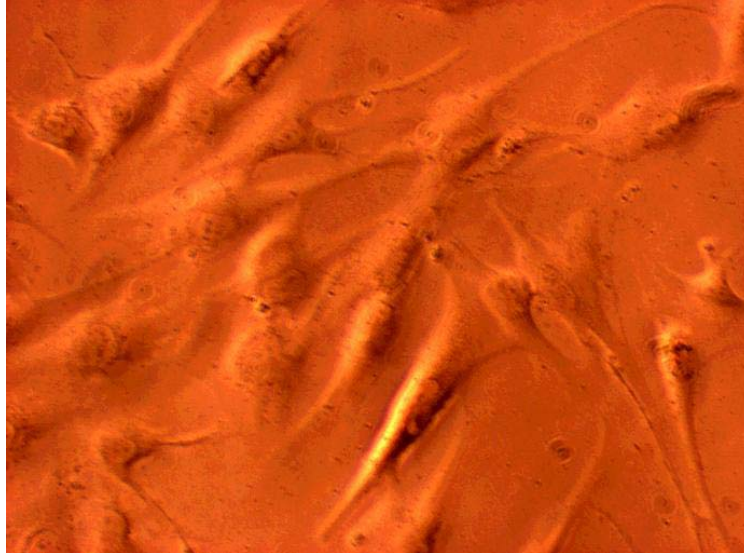
EC6

Em relação às células tratadas com EC6 (Figura 17) é possível verificar a indução significativa da expressão de VEGF comparando-se com o controle no tempo 4h, sendo que o nível da citocina declina a partir de então até o tempo de 24h. O nível protéico em 48h não foi determinado devido a problemas experimentais. O controle do tempo 24h não pôde ser analisado estatisticamente devido a problemas experimentais com os dados.

As células tratadas com esta desintegrina dimérica também apresentaram alterações morfológicas, formando-se aglomerados (Figura 21). As células tratadas com esta desintegrina parecem ter sofrido processo parecido com o provocado pela echistatina.

Os experimentos foram realizados apenas uma vez, o que poderia explicar a queda e retomada da expressão de VEGF nos fibroblastos incubados com MBP/ACLD-C. A repetição dos experimentos será necessária para confirmar os resultados. Além disso, os novos experimentos permitirão visualizar se os mesmos resultados observados com MBP/ACLD-C ocorreriam com EC6, que também exibiu queda na expressão entre os tempos de 4h até 24h e, devido a problemas de contaminação, não foi possível verificar se entre 24h e 48h haveria novo aumento na expressão, como ocorreu com a desintegrina-*like* recombinante.

(A)



(B)

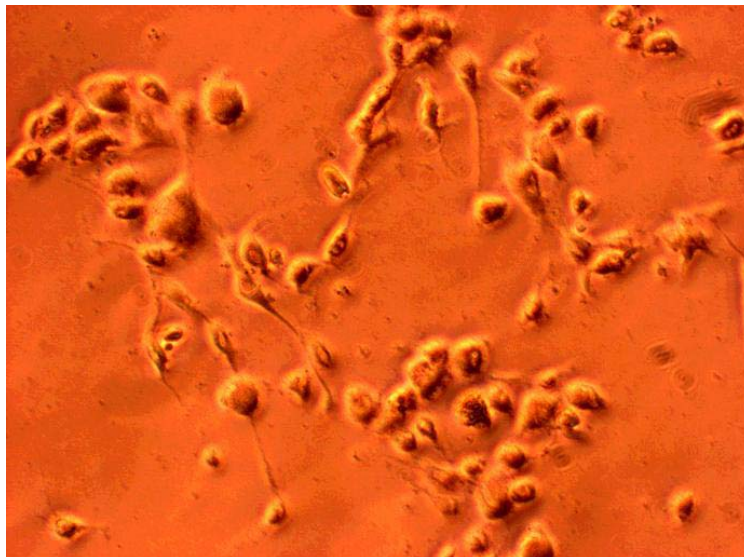
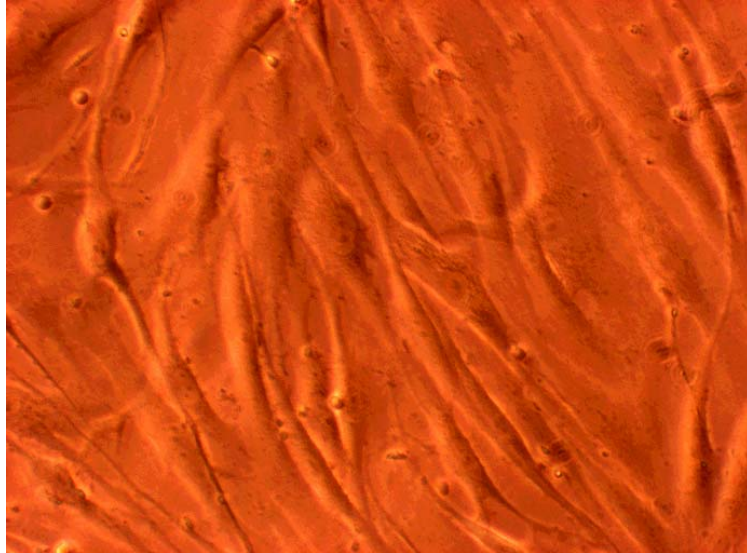


Figura 20 – Imagens de fibroblastos humanos tratados com echistatina após 48h. (A) Controle: células não tratadas; (B) células incubadas com a desintegrina.

(A)



(B)

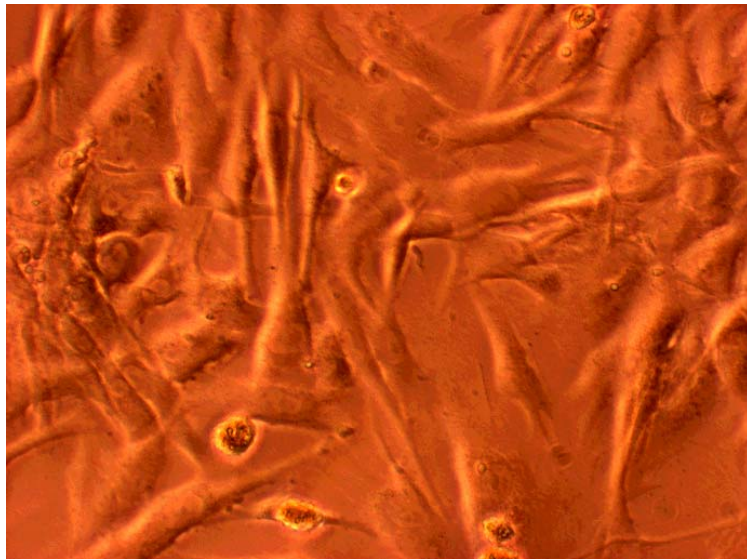


Figura 21 – Imagens de fibroblastos humanos tratados com EC6 após 24h. (A) Controle: células não tratadas; (B) células incubadas com a desintegrina.

DISCUSSÃO

Os fatores de crescimento iniciam múltiplas respostas, que incluem desde a indução de proliferação celular e expressão gênica até a migração celular e modulação de interações célula-célula. Tais mudanças fundamentais nas propriedades celulares são freqüentemente associadas com e dependem de alterações no estado adesivo das células.

Os fatores de crescimento, tais como VEGF, induzem a proliferação de células endoteliais, modificações nas expressões gênicas e migração celular diferenciada como etapas essenciais na formação de novos vasos sanguíneos (FERRARA & ALITALI, 1999). Estas mudanças são iniciadas pela ligação de VEGF aos seus receptores (VEGFR). Muitas das respostas nas células endoteliais disparadas pela ocupação de VEGFRs são também induzidas sob a ligação de receptores de adesão em células endoteliais, em particular os membros da família das integrinas. A mediação da adesão e migração celular são funções primárias das integrinas, e a expressão gênica e proliferação celular são duas das conseqüências da sinalização mediada por esses receptores. Dos 24 heterodímeros de integrinas conhecidos, pelo menos seis, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_1\beta_1$, estão implicados na angiogênese (HYNES & BADER, 1997; HYNES *et al.*, 1999).

A angiogênese é um processo essencial no crescimento e na disseminação tumoral, etapas envolvidas na metástase. A angiogênese tumoral envolve processos disparados por fatores de crescimento angiogênicos específicos, produzidos pelas células tumorais e pelo estroma circundante, principalmente por fibroblastos (PLATE *et al.*, 1994; HANAHAN *et al.*, 1996; FOLKMAN *et al.*, 1992; NAGY *et al.*, 1989). Entre tais fatores de crescimento identificados como reguladores da angiogênese (KLAGSBRUN *et al.*, 1991) VEGF (HAHANAN *et al.*, 1996) e seus receptores desempenham papel chave na angiogênese tumoral (DVORAK *et al.*, 1999; NEUFELD *et al.*, 1999; KLAGSBRUN & D'AMORE, 1996).

As células tumorais apresentam expressão diferenciada de integrinas e/ou de moléculas relacionadas. A integrina $\alpha_v\beta_3$ participa ativamente na angiogênese e no crescimento do tumor, e tem sua expressão aumentada em células vasculares como resposta a fatores de crescimento ou a fatores angiogênicos tumorais (van WAES, 1995). As integrinas $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ também são expressas em maior quantidade sob a ação de fatores de crescimento envolvidos na angiogênese (SENGER *et al.*, 1997).

A busca de terapias para o tratamento de diversas doenças envolvendo angiogênese, como o câncer, tem como um dos alvos o desenvolvimento de antagonistas de integrinas. Os venenos de serpentes possuem proteínas capazes de interagir com estes receptores. Tais proteínas, denominadas desintegrinas, podem desencadear eventos de sinalização dependentes de adesão celular mediados pela interação com integrinas.

Em estudos com a desintegrina-*like* alternagina-C (ALT-C, da serpente *Bothrops alternatus*), COMINETTI *et al.* (2004) mostraram que essa proteína induziu modificações na expressão gênica em fibroblastos. Diversos genes relacionados à proliferação e à sinalização celular tiveram sua expressão aumentada, dentre eles o VEGF. ALT-C também é capaz de estimular a proliferação em células HUVEC (COMINETTI *et al.*, 2004) e a angiogênese *in vivo* de forma dose-dependente (resultados não publicados), o que poderia ser explicado pela indução da expressão de VEGF. Tais resultados despertaram o interesse no estudo da expressão de VEGF em fibroblastos induzida por outras desintegrinas.

Assim, o capítulo 2 desta dissertação descreve os efeitos de uma desintegrina-*like* recombinante ACLD-C fusionada a MBP, sobre a expressão de VEGF em fibroblastos, comparando os resultados com o de outras duas desintegrinas, echistatina (desintegrina-RGD) e EC6 (desintegrina heterodimérica), e também com ALT-C. Para tal estudo, fibroblastos humanos foram incubados com as desintegrinas e o meio condicionado foi coletado e submetido ao ensaio de ELISA, utilizando-se o kit para detecção de VEGF (Kit R&D Systems).

ACLD-C é uma proteína desintegrina-*like* da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*, que possui o domínio desintegrina-*like* com a seqüência adesiva DCD e o domínio rico em cisteína. Esta proteína foi produzida na forma recombinante em *E. coli* fusionada a proteína MBP (*maltose-binding protein*). MBP/ACLD-C mostrou-se expressa na forma ativa, já que foi capaz de inibir a adesão de $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I de maneira dose-dependente comparando-se com a utilização de MBP não fusionada, que não apresentou atividade.

Os experimentos utilizando-se o produto de fusão MBP/ACLD-C confirmam que a desintegrina-*like* recombinante foi expressa na forma ativa, já que foi capaz de induzir a expressão de VEGF em relação ao controle. Considerando-se que as desintegrinas pertencentes ao mesmo grupo tendem a exibir atividades de forma algo semelhante, o resultado obtido para ACLD-C seria o esperado comparando-se aos resultados apresentados por ALT-C, já que ambas são desintegrinas-*like* capazes de inibir a adesão de células transfectadas K562 através da interação com a integrina $\alpha_2\beta_1$ de forma dose-dependente (SOUZA *et al.*, 2000). Entretanto, apesar de algumas semelhanças, diferentes desintegrinas

provavelmente apresentam intensidades de respostas também diferentes. Fibroblastos tratados com MBP/ACLD-C tiveram a expressão de VEGF fortemente induzida até 4h de incubação, chegando a 900% a mais que o controle (100%), enquanto nesse mesmo período de tempo praticamente não houve indução por ALT-C (COMINETTI *et al.*, 2004). No período de 4h a 24 h, houve um decréscimo na expressão de VEGF por fibroblastos tratados com a desintegrina-*Iike* recombinante até níveis mais baixos que o controle, ao passo que a expressão em 24h chegou a mais de 1000% induzida por ALT-C. O nível de VEGF volta a ser superior ao do controle nos fibroblastos tratados com MBP/ACLD-C em 48h, aproximadamente 300% a mais que o controle. Os níveis de VEGF também são mais altos nas células incubadas com ALT-C do que nas não incubadas, porém são observados níveis muito mais altos que nas células tratadas com a desintegrina-*like* recombinante, chegando por volta de 15000% a mais que o controle (COMINETTI *et al.*, 2004). Assim, a indução mediada por MBP/ACLD-C parece ser mais rápida do que em fibroblastos tratados com ALT-C, já que o nível de VEGF em 4hs de incubação com a primeira proteína são observados com ALT-C em 24hs. Entretanto, ALT-C é capaz de induzir níveis maiores de expressão em 48h, sugerindo que essa desintegrina-*like* possa manter a sinalização para a expressão de forma mais prolongada. Experimentos por períodos mais prolongados com ambas as proteínas poderiam elucidar a partir de quanto tempo de incubação com ALT-C os níveis de VEGF começam a decrescer e também se a expressão da citocina continua a aumentar após 48h e a partir de quanto tempo ela cai novamente. Os experimentos foram realizados apenas uma vez, o que poderia explicar a queda e retomada da expressão de VEGF nos fibroblastos incubados com MBP/ACLD-C. A repetição dos experimentos será necessária para confirmar os resultados.

Se por um lado as desintegrinas-*like* parecem agir como agonistas de integrinas, as desintegrinas com a seqüência adesiva RGD, mais conhecidas e estudadas, mostram-se antagonistas de integrinas. Echistatina, uma desintegrina-RGD com 5kDa da serpente *Echis carinatus* (GAN *et al.*, 1988), é um potente inibidor da ligação das integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PFAFF *et al.*, 1994), assim como a maioria das desintegrinas dessa classe. Echistatina não mantém a adesão de células porque se liga fracamente ao plástico. Entretanto, esta desintegrina na forma solúvel fornece apenas modulação de afinidade pelo receptor, mas é incapaz de ativar sinais intracelulares dependentes de integrina, ao contrário da MBP/ACLD-C e ALT-C, que são capazes de induzir a expressão de VEGF enquanto incubadas com os fibroblastos na forma solúvel. Echistatina solúvel inibe a fosforilação de pp125^{FAK} (a qual fosforila a paxilina, um dos componentes das FAs ou um intermediária que fosforila a paxilina) em plaquetas através da interação com $\alpha_{IIb}\beta_3$ (STAIANO *et al.*, 1997).

Echistatina induz o rompimento das interações de células B16-BL6 de melanoma com a ECM e isso parece envolver a redução da fosforilação de pp125^{FAK}, que por sua vez causa o desarranjo do citoesqueleto de actina e das adesões focais. ALT-C, por sua vez, induz a sinalização de integrina pela ativação da FAK e polimerização de F-actina, ao contrário da echistatina (MARIANO-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Conforme os resultados citados acima sobre a echistatina, essa desintegrina-RGD não foi capaz de induzir a expressão de VEGF superior ao controle, já que não é capaz de ativar a via de sinalização como as desintegrinas-*like* ACLD-C e ALT-C. Echistatina também não é capaz de induzir a proliferação de células HUVEC, ao contrário de ALT-C (dados não publicados). A incubação dos fibroblastos com a echistatina induz a desadesão dos fibroblastos, o que pode ser observado pela modificação da morfologia das células incubadas. Estas mudanças não são observadas na incubação com MBP/ACLD-C. A desadesão pode ser devida ao desarranjo das adesões focais. Assim, a desintegrina RGD exibiu resultados bastante diferentes dos encontrados para as desintegrinas-*like*, como seria o esperado.

O experimento utilizando-se a desintegrina heterodimérica EC6 de 15kDa (*Echis carinatus suchoreki*) (MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000) resultou em observações semelhantes, ao menos em parte, às aquelas obtidas com MBP/ACLD-C. Em 4h o nível de VEGF é superior ao controle, em cerca de 150%, declinando até 24h para valores próximos ao do controle. Devido a problemas de contaminação, o experimento não pôde ser completado até 48h. A EC6 apresenta uma seqüência adesiva MLDG na subunidade EC6A e RGD em EC6B (MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000). Considerando-se apenas a subunidade EC6B, seria esperado que não houvesse expressão de VEGF, como ocorreu com echistatina. Entretanto, a presença de uma seqüência diferente da RGD na subunidade EC6A e a interação das células com as duas subunidades mostram um efeito diferente do observado com desintegrinas-RGD, ou seja, houve disparo de sinalização para a expressão de VEGF. A morfologia dos fibroblastos incubados com EC6 mostrou alterações e agrupamentos celulares após 24h. Assim, EC6 parece ter provocado disparo de sinalizações intermediária entre MBP/ACLD-C e echistatina. A conformação de EC6 não teve o mesmo efeito que a de ACLD-C, com o nível de VEGF superior ao do controle, mas não tão alto quanto o observado com o tratamento com a desintegrina-*like*. Para comparar se EC6 apresenta os mesmos efeitos de 24h-48h mostrados por ACLD-C em relação a produção de VEGF, e desadesão completa como nos fibroblastos incubados com echistatina, será necessária a repetição do experimento por um tempo prolongado, ao menos até 48h. Outras desintegrinas diméricas, EC3 e contortostatina também foram capazes de disparar vias de sinalização mediadas pelas interações com

integrinas. EC3 possui as seqüências VGD (EC3A) e MLD (EC3B) e interage seletivamente com integrinas na superfície de neutrófilos, sendo capaz de ativar a sinalização mediada por esses receptores (COELHO *et al.*, 2004). A desintegrina homodimérica-RGD contortrostatina também é capaz de disparar vias de sinalização devido a fosforilação da FAK (RITTER *et al.*, 2000).

Os resultados citados acima sugerem que desintegrinas de diferentes grupos (desintegrinas-*like*, -RGD e diméricas) podem ativar vias de sinalização de diferentes maneiras, de acordo com suas características. Dessa forma, o estudo comparativo entre as desintegrinas é essencial para a compreensão da especificidade na capacidade de cada grupo disparar diferentes vias de sinalização.

Estudos sobre a especificidade da ACLD-C por diferentes integrinas e as vias de sinalização disparadas por essa desintegrina poderão ser de grande contribuição para a compreensão de processos de adesão e em angiogênese modulados por esse tipo de desintegrina.

CONCLUSÕES

- Um protocolo mais eficiente de expressão foi estabelecido. O produto MBP/ACLD-C foi expresso com rendimento superior em relação ao rendimento obtido pelo protocolo estabelecido anteriormente a este trabalho.
- O rendimento da expressão da MBP/ACLD-C mostrou-se bom comparado ao da maioria das desintegrinas recombinantes citadas.
- ACLD-C foi clivada com sucesso para a liberação da proteína de fusão MBP.
- MBP/ACLD-C foi produzida na forma ativa, sendo capaz de induzir a expressão de VEGF em fibroblastos humanos.
- Echistatina, ao contrário de MBP/ACLD-C, não foi capaz de induzir a expressão de VEGF acima do controle nos fibroblastos e causou a mudança de sua morfologia, o que não foi observado com MBP/ACLD-C.
- EC6, por sua vez, induziu respostas intermediárias entre as obtidas para MBP/ACLD-C e echistatina, induzindo a expressão de VEGF (porém em níveis mais baixos que MBP/ACLD-C) e alterações morfológicas menos drásticas comparando-se com echistatina.
- ACLD-C, portanto, mostra-se uma desintegrina-*like* promissora no estudo de processos biológicos envolvendo eventos adesivos modulados por esse tipo de proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, M. *et al.* Solution structure of kistrin, a protein platelet aggregation inhibitor and GP IIb-IIIa antagonist. **Science**. v.253, p.445-448, 1991.
- AHMAD, A. *et al.* Stromelysin-3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression. **Am. J. Pathol.** v.152, p.721-728, 1998.
- AKIYAMA, S. K.; OLDEN, K.; YAMADA, K. M. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. **Cancer Metast. Rev.**, v.14, p.173-189, 1995.
- ALBEDA, S.M. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis, **Lab. Invest**, v.6, p.4-17, 1993.
- APLIN, A. E; JULIANO, R.L. Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. **J. Cell Biol.** v.112, p.695-706, 1999.
- ASSAKURA, M. T. *et al.* Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Toxicon** v.41, p.217-227, 2003.
- BARAMOVA, E. N. *et al.* Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.275, p.63-71, 1989.
- BAUER, J.S. *et al.* Functional role of the cytoplasmic domain of the integrin $\alpha 5$ subunit. **J. Cell Biol.** v.122, p.209-221, 1993.
- BEDOUELLE, H.; DUPLAY, P. Production in *Escherichia coli* and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. Export of the Klenow polymerase into the periplasmic space. **Eur. J. Biochem.** v.171, p.541-549, 1988.
- BEGLOVA, N. *et al.* Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. **Nat. Struct. Biol.** v.9, p.282-287, 2002.
- 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.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. *et al.* Matrix metalloproteinases: a review. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.** v.4, p.197-250, 1993.
- BJARNASON, J. B.; TU, A.T. Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of hemorrhagic toxin e. **Biochemistry**, v.17, p.3395-3404, 1978.

- BJARNASON, J. B.N.; FOX, J. W. Haemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v.62, p.325-372, 1994.
- BLACK, R. A.; WHITE, J. M. ADAMs: focus on the protease domain. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.10, p.654-659, 1998.
- BLOBEL, C.P. *et al.* A potential fusion peptide and an integrin domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature**, v.356, p.248-252, 1992.
- BODE, W.; GOMIS-RUTH, F.X; STOCKER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzincins". **FEBS Lett.** v.331, p.134-140, 1993.
- BODE, W. *et al.* The crystal structure of neutrophil collagenase inhibited by a substrate analog reveals the essentials for catalysis and specificity. **EMBO J.**, v. 13, p.1263-1269, 1994.
- BODE, W. *et al.* Structural properties of matrix metalloproteinases. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.55, p.639-652, 1999.
- BORKAKOTI, N. Matrix metalloprotease: variations on a theme. **Prog. Biophys.Mol.Biol.** v.70, p.73-94, 1998.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-252, 1976.
- BROOKS, P.C. *et al.* Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell.** v.79, p.1157-1164, 1994.
- BUTERA, D. *et al.* Cloning, expression, and characterization of a bi-functional disintegrin/alkaline phosphatase hybrid protein. **Prot. Expr. Purif.**, v.31, p.286-291, 2003.
- BYZOVA, V.T. *et al.* A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. **Mol. Cell Biol.** v.6, p.851-860, 2001.
- CALVETE, J.J. *et al.* Identification of the disulfide bond pattern in albolabrin, an RGD-containing peptide from the venom of *Trimeresurus albolabris*: significance for the expression of platelet aggregation inhibitory activity. **Biochem.**, v.30, p.5225-5229, 1991.
- CALVETE, J.J. *et al.* The disulphide bridge pattern of snake venom disintegrins, flavoridin and echistatin. **FEBS Lett.**, v.309, p.316-320, 1992.
- CALVETE, J.J. *et al.* The disulphide bond pattern of bitistatin, a disintegrin isolated from the venom of the viper *Bitis arieanatus*. **FEBS Lett.**, v.416, p.197-202, 1997.

- CALVETE, J.J. *et al.* Disulphide-bond pattern and molecular modeling of the dimeric disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin $\alpha 5\beta 1$ antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom. **Biochem . J.**, v.345, p.573-581, 2001.
- CAMPER, L.; HELLMAN, U.; LUNDGREN-AKERLUND, E. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha 10, a cloning, a beta1-associated copllagen binding integrin expressed on chondrocytes. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.20383-20389, 1998.
- CARMELIET, P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. **Nat. Rev. Genet.** v.4, p.710-720, 2003.
- CHANG, H. -H.; TSAI, W. J.; LO, S. J. Glutathione S-transferase-rhodostomin fusion protein inhibits platelet aggregation and induces platelet shape change. **Toxicon**, v.35, p.195-204, 1997.
- CHANG, H. -H.; LO, S. J. Full-spreading platelets induced by the recombinant rhodostomin are via binding to integrins and correlated with FAK phosphorylation. **Toxicon**, v.36, p.1087-1099, 1998.
- CHANG, H. -H.; LIN, C. -H.; LO, S. J. Recombinant rhodostomin susbtrates induce transformation and active calcium oscillation in human platelets **Exp. Cell Res.**, v.250, p.387-400, 1999.
- CHERESH, D. A.; SPIRO, R. C. Biosynthetic and functional properties of an Arg-Gly-Asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen and von Willebrand factor. **J. Biol. Chem.** v.262, p.17701-17711, 1987.
- CHEN, T.;RAEL, E.D. Identification of M5, a fibrinolytic proteinase from *Crotalus molossus molosses* venom that attacks the complement. **Int. J. Biochem.Cell. Biol.** v.275, p.789-799, 1997.
- CHIANG, H. S.; YANG, R. S.; HUANG, T. F. The Arg-Gly-Asp-containing peptide, rhodostomin, inhibits in vitro cell adhesion to extracellular matrices and platelet aggregation caused by saos-2 human osteosarcoma cells. **Br. J. Cancer**, v. 71, n. 2, p. 265-270, 1995.
- CHO, C. *et al.* Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. **Science**, v.18, n.5384, p.1857-1859, 1998.
- CLARK, E. A.; BRUGGE, J. S. Integrins and signal transduction pathways: The road taken. **Science**, v.268, p.233-239, 1995.
- CLARK, E.A.; TRIKHA, M.; MARKLAND, F.S. Structurally distinct disintegrins contortrostatin and multisquamatin differentially regulate platelet tyrosyne phosphorylation. **J. Biol. Chem.** v.269, p.21940-21943, 1994.

- COMINETTI, M.R. *et al.* BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with integrin $\alpha 5\beta 1$ **Arch. Biochem. Biophys.**, v.416, p.171-179, 2003.
- COMINETTI, M.R. *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.8, p.18247-18255, 2004.
- COPPOLINO, M.G.; DEDHAR, S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. **Int. J. Cell Biol.**, v.32, p.171-188, 2000.
- CROSS, M. J. *et al.*, VEGF-receptor signal transduction. **Trends Biochem. Sci.**, v.28, n.9, p.488-494, 2003.
- CUZNER, M. L.; OPDENAKKER, G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. **J. Neuroimmunol.**, v.94, p.1-14, 1999.
- DALTRY, J. C.; WÜSTER, R. S.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution, **Nature**, v.379, p.537-540, 1996.
- DANEN, E. H. J. *et al.*, The disintegrin eristostatin interferes with integrin $\alpha 4\beta 1$ function and experimental metastasis of human melanoma cells. **Exp. Cell Res.** v.238, p.188-196, 1998.
- DAS, S. K. *et al.*, Expression of matrix metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. **Dev. Genet.** v.21, p.44-54, 1997.
- DATTA, G.; DONG, A.; WITT, J.; TU, A.T. Biochemical characterization of basilase, a fibrinolytic enzyme from *Crotalus basiliscus basiliscus*. **Arch. Biochem. Biophys.** v.317, p.365-373, 1995.
- DENNIS, M. S.; HENZE, L. W. J.; PITTI, R. M. Platelet glycoprotein Iib-IIIa protein antagonists from snake venom: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 2471-2475, 1990.
- DI GUAN, C.; LI, P.; RIGGS, P. D.; INOUE, H. Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. **Gene**, v.67, p.21-30, 1988.
- DUPLAY, P. *et al.*, Sequences of the maltE gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* k12. **J. Biol. Chem.** v.259, p.10606-10613, 1988.
- DVORAK, H. F. *et al.*, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hypermeability in angiogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.237, p.97-132, 1999.

- ELICIERI, B. P.; CHERESH, D. A. The role of αv integrins during angiogenesis: Insight into potential mechanisms of action and clinical development. **J. Clin. Invest.**, v.103, n.9, p.1227-1230, 1999.
- EMI, M. *et al.*, A novel metalloprotease/disintegrin-like gene at 17q21.3 is somatically rearranged in two primary breast cancers. **Nat. Genet.**, v.5, p.151-157, 1993.
- ETO, K. W. *et al.*, RGD-independent binding of integrin $\alpha 9\beta 1$ to the ADAM-12 and-15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.34922-34930, 2000.
- FAMBROUGH, D. *et al.*, The cell surface metalloprotease/disintegrin kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.93, p.13233-13238, 1996.
- FERRARA, N.; HENZEL, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.161, p.851-858, 1989.
- FERRARA, N. *et al.* Molecular and biological properties of the VEGF family of proteins. **Endocr. Rev.**, v.13, p.18-32, 1992.
- FERRARA, N.; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. **Nat. Med.**, v.5, p.1359-1364, 1999.
- FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.10931-10934, 1992.
- FONG, K.M. *et al.*, TIMP-1 and adverse prognosis in non-small cell lung cancer. **Clin. Cancer. Res.**, v.2, p.1369-1372, 1996.
- FRIEDERICH, C.; TU, A.T. Role of metals in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem. Pharmac.**, v.20, p.1549-1556, 1971.
- GAN, Z.R. *et al.*, Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus* **J. Biol. Chem.**, v.263, p.19827-19832, 1988.
- GASMI, A. *et al* 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, p.209-212, 2000.
- GEIGER, B. *et al.* Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. **Nat. Rev. Cell Biol.**, v.2, p.793-805, 2001.
- GIANCOTTI, F.G.; ROUSLAHTI, E. Elevated levels of the $\alpha 5\beta 1$ fibronectin receptor suppresses the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. **Cell**, v.60, p.281-290, 1990.
- GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v.285, p.1028-1031, 1999.

- GILPIN, B.J. *et al.* A novel, secreted form of human ADAM-12 (meltrin- α).provokes myogenesis in vivo. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.157-166, 1998.
- GOMEZ, D. E. *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **Eur. J. Cell. Biol.**, v.74, p.111-122, 1997.
- GOULD, R.J. *et al.* Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Coc. Exp. Biol. Med.**, v.195, p.168-171, 1990.
- GRAMS, F. *et al.* Activation of snake venom metalloproteases by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS Lett.** v.335, p.76-80, 1993.
- GREEN, L.J.; MOULD, A.P.; HUMPRIES, M.J. The integrin β subunit. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.30, p.179-184, 1998.
- GUAN, A. L. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from venom of the southern copperhead snake *Agkistrodon contortrix contortrix*, **Arch. Biochem. Biophys.**, v.289, p.197-207, 1991.
- HAAS, T.A. PLOW, E.F. Integrin-ligand interactions: a year in review. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.6, p.656-662, 1994.
- HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v.86, p. 353-364, 1996.
- HARRIS, A.L. von Nippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. **Oncologist.**, v.5, p.32-36, 2002.
- HAY, E.D. An overview of epitheliomesenchymal transformation. **Acta Anaf.**, v.154, p.6-20,1995.
- HIDER, R. C.; KARLSSON, E.; NAMIRANIAN, S. Separation and purification of toxins from snake venoms. In: HARVEY, A.L. (Ed.). **Snake Toxins**. New York: Pergamon Press, 1991. p.1-34.
- HITE, L.A. cDNA sequence for four snake venom metalloproteinases: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p.182 -191, 1994.
- HOCKNEY, R. C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.**, v.12, p.456-463, 1994.
- HOGG, N.; BATES, P.A. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. **Matrix Biol.**, v.19, p.11-222, 2000.
- HOOPER, N. M. Families of zinc metaloproteases. **FEBS Letters.**, v.354, p.1-6, 1994.
- HORIUCHI, K. *et al.* Potential role for ADAM 15 in pathological neovascularization in mice. **Mol. Cel. Biol.**, v.23, n.16, p.5614-5624, 2003.

- HORWITZ, A. *et al.* Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin – a membrane linkage. **Nature**, v.320, p.531-533, 1986.
- HUANG, T.F.; OUYANG, C.: Action mechanism of the potent platelet aggregation inhibitor from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Thromb. Res.**, v.33, p.125-138, 1984.
- HUANG, T.F. *et al.* Trigramin: a low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **J. Biol. Chem.**, v.262, p.16157-16163, 1987.
- HUANG, T.F.; WU, Y.J.; OUYANG, C. Characterization of a potent platelet aggregation inhibitor from *Agkistrodon rhodostoma* snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v.925, p.248-257, 1987.
- HUANG, T. F.; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrins: the naturally-occurring antagonists of platelet fibrinogen receptor. **J. Toxicol.**, v.13, n.3, p.253-273, 1994.
- HUANG, T. F. What have snakes taught us about integrins? **Cell Mol. Life Sci.**, v.54, p.527-540, 1998.
- HUGHES, P.E. *et al.* Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.6571-6574, 1996.
- HUMPRIES, M.J. Integrin structure. **Biochem Soc. Trans.**, v.28, p.311-339, 2000.
- HUMPRIES, M.J. *et al.* Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. **Trends Biochem. Sci.**, v.28, p.313-320, 2003.
- HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors, **Cell**, v.48, n.4, p.549-54, 1987.
- HYNES, R.O. Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v.69, p.11-25, 1992.
- HYNES, R.O. Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? **Dev. Biol.**, v.180, p.402-412, 1996.
- HYNES, O. R. Millenium Issue - Cell adhesion: old and new questions. **Trends Genet.**, v.15, n.12, p.M33, 1999.
- HYNES, R.O. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. **Nat. Med.**, v.8, p.918-921, 2002.
- IBA, K. *et al.* Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (Meltrin α) supports tumor cell adhesion. **Am. J. Pathol.**, v.154, p.1489-1501, 1999.
- IEMMA, M. R. C. **Metaloproteases-desintegrinas de venenos de serpente: purificação, expressão heteróloga e interação com a integrina $\alpha_2\beta_1$.** 2002. 123p. Tese (Doutorado em Fisiologia), 2002.

- IMAI, K. *et al.* Hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon bilineatus* (common cantil). **Int. J. Biochem.**, v.21, p.667-673, 1989.
- JIA, L.G. *et al.* Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon.**, v.34, p.1269-1276, 1996.
- JIA, L. G. *et al.* Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of Atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.13094-13102, 1997.
- JIA, L.G. *et al.* Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.373, p.281-286, 2000.
- JOHNSON, E. K.; OWNBY, C. L. Isolation of a hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of the hemorrhage induced by the toxin in mice. **Int. J. Biochem.**, v.25, p.267-278, 1993.
- JOHNSON, G.L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v.298, p.1911-1912, 2002.
- KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. Insights into mechanism of haemorrhagic caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.34, p.627-642, 1996.
- KAMIGUTI, A.S. *et al.* Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. **FEBS Lett.**, v.549, p.129-134, 2003.
- KANG, I. C. *et al.* Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.275, p.169-173, 2000.
- KATAGIRI, T.; HARADA, Y.; EMI, M. Human metalloprotease/disintegrin like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.68, p.39-44, 1995.
- KILLAR, L.; WHITE, J.; BLACK, R.; PESCHON, J. Adamalysins – a family of metzincins including TNF- α CONVERTING ENZYME (tace). **An. NY Acad. Sci.**, v.878, p.442-452, 1999.
- KIM, D. *et al.* Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. **Thrombosis Res.**, v.105, p.79-86, 2002.

- KINI, R. M.; EVANS, H. J. Inhibition of platelet aggregation by a fibrinogenase from *Naja nigricollis* venom is independent of fibrinogen degradation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1095, p.117-121, 1991.
- KINI, R.M.; EVANS, H.J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v.30, p.265-293, 1992.
- KIWON, S. *et al.* The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.302, p.502-508, 2003.
- KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P. A. Regulators of angiogenesis. **Annu. Rev. Physiol.**, v.53, p.217-239, 1991.
- KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P. A. Vascular endothelial growth factor and its receptors. **Cytok. Growth Factor Rev.**, v.7, p.259-270, 1996.
- KLAUS, W. *et al.* Determination of the disulphide bonding pattern in proteins by local and global analysis of nuclear magnetic resonance data. Application to flavoridin. **J. Mol. Biol.**, v.232, p.897-906, 1993.
- KUNO, K.; TERASHIMA, Y.; MATSUSHIMA, K. ADAMTS-1 an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix. **J. Biol.Chem.**, v.274, p.18821-18826, 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAFLAME, S.E.; AUER, K.L. Integrin signaling. **Sem. Cancer Biol.**, v.7, p.111-118, 1996.
- LLANO, E. *et al.* Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase A overexpressed in brain tumours, **Cancer Res.** v.59, p.2570-2576, 1999.
- LASKY, L.A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science**, v.258, p.964-969, 1992.
- LAVALLIE, E. R. *et al.* A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. **Biotech.**, v.11, p.187-193, 1993.
- LIGER, D. *et al.* Over-production, purification, and properties of the uridine-diphosphate-*N*-acetylmuramate:L-alanine ligase from *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.**, v.230, p.:80-87, 1995.
- LIN, T.H. *et al.* Cell anchorage permits efficient signal transduction between ras and its downstream kinases. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.8849-8852, 1997.

- LIU, Q. *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding haemorrhagic toxin acutolysin A from *Agkistrodon acutus*. **Toxicon**, v.37, p.1539-1548, 1999.
- LIU, S.; CALDERWOOD, D.A.; GINSBERG, M.H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. **J. Cell Sci.** v. 113, p. 3563-3571, 2000.
- LO, S.H.; CHEN, L.B. Focal adhesion as a signal transduction organelle. **Cancer Metastas. Rev.**, v.13, p.9-24, 1994.
- LOECHEL, F. *et al.* ADAM-12S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.278, p.511-515, 2000.
- MAINA, C. V. *et al.* An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. **Gene**, v.74, p.365-373, 1988.
- MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v.20, p.955-972, 1982.
- MARCINKIEWICZ, C. *et al.* Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for the recognition of α Ib β 3 and α V β 3 integrins and expression of ligand-induced binding site, **Blood**, v.90, p.1565-1575, 1997.
- MARCINKIEWICZ, C. *et al.* EC3, a novel heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus* venom inhibits α 4 and α 5 integrins in an RGD-independent manner. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.12468-12473, 1999a.
- MARCINKIEWICZ, C. *et al.* Structural and functional characterization of EMF-10, a heterodimeric disintegrin from *Eristocophis macmahoni* venom that selectively inhibits α 5 β 1 integrin. **Biochem. J.**, v.38, p.13302-13309, 1999b.
- MARCINKIEWICZ, C. *et al.* Inhibitory effects of MLCG-containing heterodimeric disintegrins reveal distinct structural requirements for interaction of the integrin α 9 β 1 with VCAM-1, tenascin-C, and osteopontin. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.31930-31937, 2000.
- MARIANO-OLIVEIRA, A. *et al.* Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur. J. Biochem.**, v.270, p.4799-4808, 2003.
- MARKLAND, F.S. Inventory of α and β -fibrinogenases from snake venom **Thromb. Haemost.**, v.65, p.438-443, 1991.
- MARKLAND, F.S., Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an update inventory. **Thromb. Haemost.**, v.79, p.668-674, 1998.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the homeostatic system. **Toxicon**, v.36, p.1749-1800, 1998.

- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1477, p.146-156, 2000.
- McLANE, M.A. *et al.* Importance of the structure of the RGD- containing loop in the disintegrins echistatin and eristostatin for recognition of α -IIb β 3 and α v β 3 integrins. **FEBS Lett.**, v.391, p.139-143, 1996.
- MEIER, J. Venomous snakes. In: KSTOCKER, K. F. **Medical Use of Snake Venoms Proteins**. Boca Ranton: CRC Press, 1990. p.1-32.
- MILNER, R. *et al.* Distinct roles for astrocyte α v β 5 α v β 8 integrins in adhesion and migration. **J. Cell Sci.**, v.112, p.4271-4279, 1999.
- MIYAMOTO, S. *et al.* Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosin kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. **J. Cell Biol.**, v.135, p.1633-1642, 1996.
- MORO, L. *et al.* Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. **EMBO J.**, v.17, p.6622-6632, 1998.
- MOURA-DA-SILVA, A.M. *et al.* Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: Expression in *Escherichia coli* and inhibition of the platelet – collagen interaction. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.369, p.295-301, 1999.
- MOURA-DA-SILVA, A.M. *et al.* Selective recognition of α 2 β 1 integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Thromb.**, v.102, p.153-159, 2001.
- MULLER, B. H. *et al.* Improving *Escherichia coli* alkaline phosphatase efficacy by additional mutations inside and outside the catalytic pocket, **Chem. Biol. Chem.**, v.2, p.517-523, 2001.
- MURRAY, G.I. *et al.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. **Gut.**, v.43, p.791-797, 1998.
- MYLES, D.G.; PRIMAKOFF P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. **Biol. Reprod.**, v.56, p.320-327, 1997.
- NAGASE, H.; WOESSNER JR., F. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.31, p.21491-21494, 1999.
- NAGY, J. A. *et al.* Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.948, p.305-326, 1989.
- NEEPER M.P.; JACOBSON M.A.: Sequence of a cDNA encoding the platelet aggregation inhibitor trigramin. **Nucl. Acids.Res.**, v.18, p.4255, 1990.

- NEUFELD, G. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **FASEB J.**, v.13, p.9-22, 1999.
- NIEWIAROWSKI, S. *et al.* Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Sem. Hematol.**, v.31, p.289-300, 1994.
- NIKAI, T. *et al.* 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, p.6-15, 2000.
- NILSSON, B. *et al.* A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. **Protein Eng.**, v.1, p.107-113, 1987.
- NISHIDA, D. *et al.* cDNA cloning and deduced amino acid sequence of prothrombin activator (ecarin) from Kenyan *Echis carinatus* venom. **Biochem.**, v.34, p.1771-1778, 1995.
- OSHIKAWA, K.; TERADA, S. Ussuristatin 2, a novel KGD- bearing disintegrin from *Agkistrodon ussuriensis* venom. **J. Biochem.**, v.125, p.31-35, 1999.
- OUYANG, C, HUANG, T.F.: Potent aggregation inhibitor from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Biochem Biophys Acta**, v.757, p.332-341, 1983.
- OUYANG, C, YEH, H.I.; HUANG, T.F: A potent platelet aggregation inhibitor purified from *Agkistrodon halys* (mamushi) snake venom. **Toxicon**, v.21, p.797-804, 1983
- OUYANG, C.; TENG, C. -M.; HUANG, T. -F. Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.281, p.151-163, 1990.
- PAINE, M. J. I. *et al.* Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.22.869-22876, 1992.
- PARK, D. *et al.* Cloning and characterization of novel disintegrins from *Agkistrodon halys* venom. **Mol. Cells**, v.8, p.578-584, 1998.
- PARKS, W. C.; MECHAM, R. P. **Matrix Metalloproteinases**, Academic Press, San Diego, 1998.
- 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.
- PHILLIPS, D. R.; CHARO, I. F.; SCARBOROUGH, R. M. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. **Cell**, v.65, n.3, p.359-362, 1991.
- PIRKLE, H. Thrombin-like venom enzymes from snake venoms: An update inventory. **Thromb. Haemost.** 1998.

- PIRKLE, H.; THEODOR, I. Thrombin-like venom enzymes: Structure and function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.281, p.165-167, 1990.
- PLATE, K. H.; BREIER, G.; RISAU, W. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. **Brain Pathol.**, v.4, p.207-218, 1994.
- PLOW, E.F. *et al.* Ligand binding to integrins. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.21785-21788, 2000.
- PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. The ADAM gene family-surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet.**, v.16, p.82-87, 2000.
- RAMOS, O.H.P.; CARMONA, A.K.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom pro-metalloprotease. **Prot., Expr. Purif.** v.28, p.34-41, 2003.
- REE, AH. *et al.* High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 AND TIMP-2) in primary breast carcinoma are associated with development of distant metastases. **Clin. Cancer Res.**, v.3, p.1623-1628, 1997.
- RIGGS, P. D. Expression and purification of amltose-binding protein fusions. In: ASSO, G. (Eds.). **Current Protocols in Molecular Biology** New York: Wiley Interscience, 1992.
- RITTER, M. R.; MARKLAND JR, F. S. Differential regulation of tyrosine phosphorylation in tumor cells by contortrostatin, a homodimeric disIntegrin, and monomeric disintegrins echistatin and flavoridin. **Toxicon**, v.39, p.283-289, 2001.
- ROOKE, J. *et al.* A conserved metalloprotease-disintegrina protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. **Science**, v.273, p.1227-1231, 1996.
- RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins **Science**, v.238, p.491-497, 1987.
- RUSSEL, F. E. Venoms. **Snake Venom Poisoning**, Philadelphia: Lippincott, 1980. p.139-234.
- SCARBOROUGH, R. M. *et al.* Barbourin: a GPIIb/IIIa specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus barbouri*. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.9359-9362, 1991.
- SCHALLER, M.D.; PARSONS, J.T. Focal adhesion kinase and associated proteins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.6, p.705-710, 1994.
- SCHLAEPFER, D.D. *et al.* Integrin-mediated signal transduction linked to ras pathway by GRB2 binding to the focal adhesion kinase. **Nature**, v.372, p.786-791, 1997.
- SCHLAEPFER, D.D.; JONES, K. C.; HUNTER, T. Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: Summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. **Mol. Cell. Biol.**, v.18, p.2571-2585, 1998.

- SCHWARTZ, M.A.; SCHALLER, M.D.; GINSBERG, M.H. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.11, p.549-599, 1995.
- SENGER, D.R: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor: multiple biological activities for promoting angiogenesis. In: VOEST, E. E.; D'AMORE, P.A. (Eds.). **Tumor Angiogenesis and Microcirculation**. New York: Marcel Dekker, 2001. p.167-184.
- SCHMIDT, M.; LUPAS, A. N; FINLEY, D. Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.3, p.584-591; 1999.
- SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. *et al.* Expression, Refolding, and Activity of a Recombinant Nonhemorrhagic Snake Venom Metalloprotease. **Prot. Expr. Purif.**, v.19, p. 41-47, 2000.
- SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.;SOUZA, D. H.; OWNBY, C. L. Analysis of a cDNA sequence encoding a novel member of the snake venom metalloproteinase, disintegrin-like, cysteine-rich (MDC) protein family from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1342, n.2, p.109-115, 1997.
- SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. *et al.* Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic, and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca Ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v.28, p.262-273, 1990.
- SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) **Toxicon**, v.25, p.1135- 1144, 1987.
- SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. (1990) Atividade anticoagulante de toxinas dos venenos de *Bothrops insularis* e *Bothrops jararacussu*. **Mem. Inst. Butantan**, v.52 , p.73-74, 1990 (suplemento).
- SENGER, D.R.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M.; PERRUZZI, C.A.; HARVEY, V.S.; DVORAK, H.F. Tomur cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**. V. 219, p. 983-985, 1983.
- SENGER, D. R. *et al.* Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.13621-13627, 1997.
- SENGER, D. R. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor: multiple biological activities for promoting angiogenesis. In: VOEST, E. E.; D'AMORE, P. A. (Eds.). **Tumor Angiogenesis and Microcirculation**. New York: Marcel Dekker, 2001, p.167-184.
- SHAH, N.K.; REJTO, P.A.; VERKHIVKER, G.M. Structural consensus in ligand-protein docking identifies recognition peptide motifs that bind streptavidin. **Proteins**, v.28, p.421-443, 1997.

- SHAH, J. R. et al. The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metaloprotease Yme1p complements a yeast yme1 disruptant. **FEBS Lett.**, v.478, p.267-270, 2000.
- SHATTIL, S. J.; KASHIWAGI, H.; PAMPORI, N. Integrin Signaling: The Platelet Paradigm. **Blood**, v.91, p.2645-2657, 1998.
- SHEU, J. R.; LIN, C. H.; HUANG, T. F. Triflavin, an antiplatelet peptide, inhibits tumor cell-extracellular matrix adhesion through an arginine-glycine-aspartic acid-dependent mechanism. **J. Lab. Clin. Med.**, v.123, n.2, p.256-263, 1994.
- SHEU, J. R.; HUANG, T. F. Ex-vivo and in-vivo antithrombotic effect of triflavin, an RGD-containing peptide. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.46, n.1, p.58-62, 1994.
- SHIMOKAWA, K-i. et al. Expression, activation, and processing of the recombinant snake venom metaloproteinase, Pro-Atrolysin E. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.335, p.283-294, 1996.
- SHIMOKAWA, K. *et al.* Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cystrin-rich-two-domain protein from *Crotalus atrox* venom. **Arch. Biochim. Biophys.**, v.343, p.35-43, 1997.
- SHIMOKAWA, K. *et al.* Isolation, sequence, analysis and biological activity of atrolysin E/D, the non-RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. **Arch Biochem Biophys.**, v.354, p.239-246, 1998.
- SMITH, J.B. *et al.* Characterization of a monomeric disintegrin, cocellatusin, present in the venom of the Nigerian carpet viper, *Echis ocellatus*. **FEBS Lett.**, v.512, p.111-115.
- SOUZA, D. H. *et al.* The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease inhibits $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion, **Arch. Biochem. Biophys.**, v.384, n.2, p.341-350, 2000.
- SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system, **Nature**, v.346, n.6283, p.425-434, 1990.
- SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm **Cell**, v.76, p.301-314, 1994.
- SRIRAMARAO, P.; STEFFNER, K.R. GEHLSON, K.R. Biochemical evidence for a homophilic interaction of the $\alpha 3\beta 1$ integrin. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.22036-22041, 1993.
- STAATZ, W. D. *et al.* The membrane glycoprotein Ia-Iia (VLA2) complex mediates the Mg^{2++} -dependent adhesion of platelets to collagen. **J. Cell Biol.**, v.108, p.1917-1924, 1989.
- STAIANO, N. *et al.* Echistatin induces decrease of pp125FAK phosphorylation, disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions, and detachment of fibronectin-adherent melanoma cells. **Eur. J. Cell Biol.**, v.73, p.298-305, 1997.

- STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.17, p.462-516, 2001.
- STETLER-STEVENSON, W. G.; YU, A. E. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. **Semin. Cancer Biol.**, v.11, p.143-152, 2001.
- STOCKER, K. Composition of snake venoms. In: PIRKLE, H. & STOCKER, F. (Eds.). **Haemostasis and animal venoms**, Boca Ranton: CRC Press, 1990, p.33-56.
- STOCKER, W. *et al.* The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci.**, v.4, n.5, p. 823-840, 1995.
- STONE, A.L.; KROEGER, M.; SANG, Q.X. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins. **J. Protein Chem.**, v.18, p.447-465, 1999.
- STREULI, C. Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. **Curr. Op. Cell Biol.**, v.11, p.634-640, 1999.
- SYMINGTON, B.E.; TAKADA, Y.; CARTE, W.G. Interaction of integrins $\alpha 3\beta 1$ and potential role keratinocyte intercellular adhesion. **J. Cell Biol.**, v.120, p.523-535, 1993.
- TALVENSAARI - MATILLA, A. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a maker of aggressiveness in breast carcinoma. **Cancer**, v.83, p.1153-1162, 1998.
- TAKEICHI, M. *et al.* Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the caderin superfamily. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.**, v.355, p.885-890, 2000.
- TANG, B. L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.33, p.33-44, 2001.
- TAOOKA, Y. *et al.* The integrin $\alpha 9\beta 1$ mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. **J. Cell Biol.**, v.145, p.413-420, 1999.
- TENG, C. -M.; HUANG, T. -F. Inventory of exogenous inhibitors of platelet aggregation. **Thromb. Haemostasis**, v.65, p.624-626, 1991a.
- TENG, C. -M.; HUANG, T. -F. Snake venom constituents that affect platelet function. **Platelets**, v.2, p.77-87, 1991b.
- TERADA, S. *et al.* Purification and amino acid sequence of brevilysin L6, a non-hemorrhagic metalloprotease from *Agkistrodon halys brevicaudus* venom. **J. Biochem.**, v.125, p.64-69, 1999.

- TRIKHA, M.; SCHMITMEIER, S.; MARKLAND, F.S. Purification and characterization of fibrolase isoforms from venom of individual southern copperhead (*Agkistrodon contortrix contortrix*) snakes. **Toxicon**, v.32, p.1521- 1531,1994.
- TU, A. T. Snake venoms: general background and composition. In: -----, **Venoms: Chemistry and molecular biology**, New York: John Wiley and Sons, 1988. p. 1-19.
- TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.391, p.37-62, 1996.
- USAMI, Y. *et al.* A 28kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. **Biochem.Res.Comm.**, v.201, p.331-339, 1994.
- van WAES, C. Cell adhesion and regulatory molecules invilved in tumor formation, hemotasis, and wound healing. **Head Neck**, v.17, p.140-147, 1995.
- VELASACO, G. *et al.* Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.4570-4576, 1999.
- VINOGRADOVA, O. *et al.* A structural mechanism of integrin α IIb β 3 “inside out” activation of regulated by its cytoplasmic face. **Cell**, v.110, p.587-597, 2002.
- WAGNER, G.; WISS, D. F. Cell surface adhesion receptors. **Curr. Op. Struct. Biol.**, v.4, p.841-851, 1994.
- WANG, J. -H. *et al.* Cloning and characterization o adinhibitor, a novel disintegrin from the snake venom of *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger*, **Acta Bio. Biophys. Sin.**, v.36, n.6, p.425-429, 2004.
- WEN, C.; METZSTEIN, M.M.; GREENWALD, I. SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophita* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. **Development.**, v.124, p.4759-4767, 1997.
- WESKAMP, G; BLOBEL, C. P. A family of cellular proteins related to snake venom disintegrins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.2748-2751, 1994.
- WHITTAKER, C.A.; HYNES, R.O. Distribution and evolution of the von Willebrand/Integrin A domain: a widely dispersed domain with roles in cell adhesion and elsewhere. **Mol. Biol. Cell**, 2002.
- WIERZBICKA-PATYNOWSKI, S. *et al.* Structural requirements of echistatin for the recognition of α (v) β (3) and α (5) β (1) integrins, **J. Biol. Chem.**, v.274, p.37809-37814, 1999.
- WILLIS, T.W.; TU, A.T. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from wetern diamondblack rattlesnake venom. **Biochem.**, v.27, p.4769-4777, 1988.

- WOESSNER, J. F. In: PARKS, W. C.; MECHAN, R. P. (Eds.), **Matrix metalloproteinases**, San Diego: Academic Press, 1998. p.1-14.
- WOLFSBERG, T.G. *et al.* The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloproteinase and disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.90, p.10783-10787, 1993.
- WOLFSBERG, T.G. *et al.* ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **J. Cell Biol.**, v.131, p.275-278, 1995.
- WOLFSBERG, T.G. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.10783-10787, 1993.
- WOLFSBERG, T. G.; WHITE, J. M. ADAMs in fertilization and development. **Dev. Biol.**, v.180, p.389-401, 1996.
- WOLFSBERG, T.G.; MCENTYRE, J.;SCHULER, G.D. Guide to the draft human genome. **Nature**, v.409, p.824-826, 2001.
- YAMADA, K. Adhesive recognition sequences. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.12809-12812, 1991.
- YAMADA, D.; SERIYA, F.; MORITA, T. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in Echis carinatus venom with a unique catalytic mechanism. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.5200-5207, 1996.
- YEH, R. H. *et al.* Real Time Visualization of Protein Kinase Activity in Living Cells. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.13, p.11527-11532, 2002.
- YOU, W. -K. *et al.* A novel disintegrin-like domain of a high molecular weight metalloprotease inhibits platelet aggregation. **Biochem. And Biophys. Res. Commun.**, v.309, p.37-642, 2003.
- XIONG, J.P. *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. **Science**, v.294, p.339-345, 2001.
- XIONG, J.P. *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. **Science**, v.296, p.151-155, 2002.
- ZHOU, Q., SMITH, J.B.; GROSSMAN, M.H. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from Crotalus atrox (western diamondblack rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **Biochem. J.**, v.307, p.411-417, 1995.
- ZHOU, Q. *et al.* Contortrostatin, a dimeric disintegrin from Agkistrodon contortrix contortrix, inhibits breast cancer progression. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.61, p.249-260, 2000.
- ZHOU, Q. *et al.* Contortrostatin, a homodimeric disintegrin, binds to integrin $\alpha v\beta 5$. **Biochem. Biophys.Res.Comm.**, v.267, p.350-355, 2000a.

ZHOU,Q. *et al.* Molecular cloning and functional expression of contortrostatin, a homodimeric disintegrin from southern copperhead snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v.375, p.278-288, 2000b.