

# ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DA LEUCUROGINA EM MATRIZ ESPONJA

Haline Candido Vicente<sup>1</sup>, Débora Ayame Higuchi<sup>2</sup>

Estudante do Curso de Bel. Química; e-mail: halinecandido@yahoo.com.br<sup>1</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; email: ayame@umc.br<sup>2</sup>

**Área de conhecimento:** Ciências Biológicas

**Palavras-chave:** desintegrina-símile, angiogênese, matriz esponja.

## INTRODUÇÃO:

O termo integrina foi inicialmente proposto para enfatizar a função destes receptores na integração do citoesqueleto celular com os componentes da MEC (HYNES, 1987). Um grande número destas proteínas é estudado e consistem em duas subunidades sendo uma denominada  $\alpha$ (120 - 180 kDa) e a outra  $\beta$  (90 - 110 kDa) ligadas não covalentemente. A combinação das subunidades gera receptores que podem interagir com repertório de ligantes da superfície celular, da MEC ou com proteínas solúveis. As integrinas,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$  e seus ligantes, atualmente são alvos de estudos nos processo angiogênico encontrados na inflamação e câncer. O estudo sobre antagonistas de integrinas que participam do processo de desenvolvimento tumoral vêm sendo uma das alternativas promissoras no tratamento do câncer. Um alvo de estudo são os venenos de serpente que apresentam uma diversidade de componentes bioativos, entre eles os fragmentos conhecidos como desintegrina e desintegrinas-símiles, derivados das SVMPS (snake venom metalloproteinases) e descritos por antagonizarem as integrinas (McLane e cols, 2004; Minea e cols, 2005). Estes peptídeos possuem uma sequência de aminoácidos, “motif”, RGD ou KGD para desintegrinas e ECD para desintegrinas-símiles. Essas sequências são similares também a parte da estrutura primária de componentes da matriz extracelular (MEC) e por isso antagonizam a interação entre MEC e integrinas, sendo desta forma, a atuação das desintegrinas e desintegrinas-símiles na inibição da agregação, adesão, migração e proliferação celular. Estudos mostram que a produção de desintegrinas-símiles recombinantes pode servir como ferramenta capaz de mostrar a relação entre integrinas e componentes da MEC, esclarecendo os processos da sinalização celular dependente desta interação, como angiogênese e progressão tumoral. A produção recombinante da desintegrina-símile do veneno da serpente *B. leucurus* foi realizada para o estudo do domínio que não é encontrada livre na natureza. Esta proteína, nomeada como leucurogina, foi produzida, através de técnicas de recombinação gênica, de segmentos correspondentes apenas ao domínio desintegrina-símile da *B. leucurus*, pelo sistema *P.pastoris* (Higuchi, 2009).

## OBJETIVO:

Este projeto tem como propósito a caracterização da atividade antiangiogênica *in vivo* da leucurogina, utilizando modelo de matriz esponja.

## METODOLOGIA:

*-Quantificação de proteína:* As amostras da proteína de interesse foram analisadas pelos métodos de Bradford, as amostras foram estimadas utilizando como padrão soroalbumina bovina (BSA) e logo analisadas por técnicas espectrofotometria. O método de Lowry e cols, (1951) foi utilizado também para estimar a concentração protéica das amostras, cuja concentração foi superior a 200 $\mu$ g/mL.

*-Ensaio biológico:* A proteína recombinante purificada foi utilizada em testes *in vivo* para determinação da atividade biológica. Foram utilizados camundongos Swiss machos saudáveis, de peso em torno de 30 g, provenientes do biotério da UMC.

*-Implante de esponja:* Discos de esponja de poliéster poliuretano foram implantados no dorso de camundongos machos de aproximadamente 2 meses de idade, com o objetivo de causar uma inflamação no tecido dos bichos para a realização de ensaios biológicos e verificação da atividade anti-angiogênica da proteína. Para isso foram aplicadas durante 15 dias de tratamento doses diárias da proteína recombinante, em diferentes concentrações, em grupos de camundongos e posteriormente feito a análise das esponjas.

*-Dosagem de Hemoglobina:* Após os dias de tratamento com a proteína nos camundongos para ensaios biológicos, os mesmos são submetidos ao sacrifício para a determinação e dosagem de hemoglobina nas esponjas e verificação da ação angiogênica da Leucurogina.

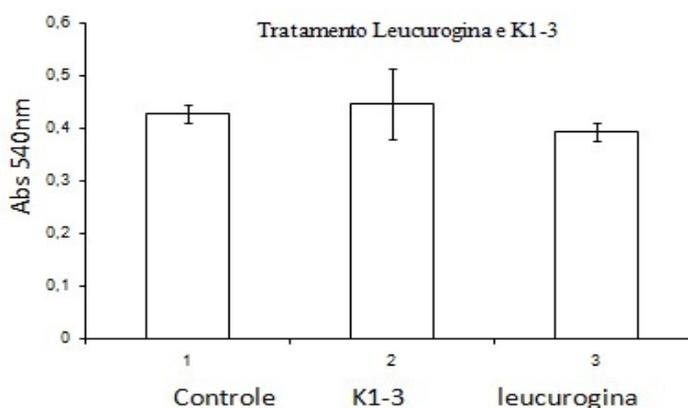
## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O material selecionado para os ensaios biológicos foi analisado em gel de poliacrilamida, verificando o grau de pureza, foi realizada diálise de forma exaustiva, garantindo a eliminação de sais e a concentração protéica foi estimada de forma a injetar quantidades exatas de leucurogina nos animais durante o tratamento.

Para análise da atividade da leucurogina foram utilizados animais controle (salina 0,9%), e também animais tratados com outra proteína recombinante, K1-3 desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa e que já foi descrita por apresentar atividade antiangiogênica. (Santos, 2010).

O tratamento para ambas as proteínas recombinantes ocorreu em quantidades diárias que variaram de 1 a 20 µg de proteínas.

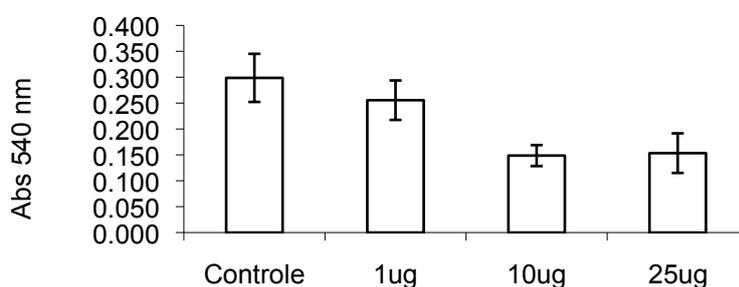
No experimento representado abaixo pela figura 1, utilizou-se 1 µg para as proteínas recombinantes. Apesar da redução do nível de hemoglobina apresentada nas esponjas dos animais dos grupos de ambas as proteínas recombinantes, a diferença não foi estatística quando comparado ao grupo controle (salina 0,9%).



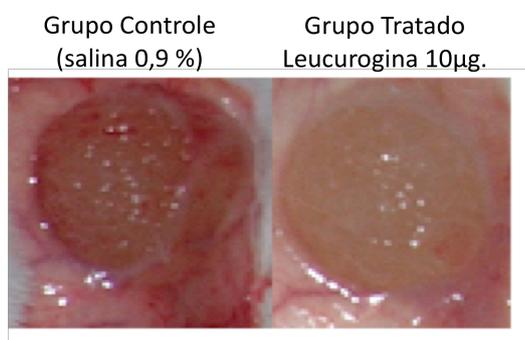
**Figura 1:** Referente ao tratamento realizado com dois tipos de proteínas recombinantes, comparando os efeitos angiogênicos das mesmas.

Quando o experimento foi realizado aumentando a quantidade da proteína utilizada foi possível obter resultados com diferenças significativas para o tratamento com leucurogina. Após o tratamento foi verificado o nível de hemoglobina das esponjas e com isso pode-se observar que a proteína de interesse deste projeto, atuou com um satisfatório resultado para

a diminuição dos níveis angiogênicos, com doses diárias de 1µg, 10µg, 25µg da proteína injetada diariamente nos camundongos.



**Figura 2:** Referente ao ensaio biológico para o teste de redução da atividade angiogênica em matrizes esponjas, utilizando a proteína de interesse como método principal para a redução da atividade angiogênica e comparação ao grupo controle utilizando salinas 0,9%.



**Figura 3:** Imagem das esponjas retiradas do tratamento referente à figura 2.

### CONCLUSÕES:

O Modelo de análise da atividade antiangiogênica utilizado neste trabalho se mostrou satisfatório, por ser um método simples e ilustrativo. A proteína na dose de 10 e 25 µg atuou bem como um agente antiangiogênico no modelo citado.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

HIGUCHI, D. A. **Purificação e caracterização biológica de uma desintegrina-símile recombinante produzida de clone isolado da glândula salivar da serpente *B. leucurus***. Tese de Doutorado em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes, 2009.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MCLANE, M. A.; SANCHEZ, E. E.; WONG, A.; PAQUETTE-STRAUB, C.; PEREZ, J. C. Disintegrins. **Current Drug Targets - Cardiovascular & Haematological Disorders**, v. 4, n. 4, p. 327-355, 2004.

SANTOS IC, Silbiger VN, Higuchi DA, Gomes MA, Barcelos LS, Teixeira MM, Lopes MT, Cardoso VN, Lima MP, Araujo RC, Pesquero JB, Pesquero JL. Angiostatic activity of human plasminogen fragments is highly dependent on glycosylation. **Cancer Science**. v.. 2, p. 453-459, 2010.

**AGRADECIMENTOS:**

À FAEP pela concessão da bolsa de iniciação científica.