



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PRODUÇÃO E ESTUDO DE ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DE PROTEÍNAS DE FUSÃO
ENDOSTATINA-DOMÍNIO BH3 DAS PROTEÍNAS PRÓ-APOPTÓTICAS PUMA E BIM**

Natan Versati da Silva

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Profa. Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

São Paulo

2015

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**PRODUÇÃO E ESTUDO DE ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DE PROTEÍNAS DE FUSÃO
ENDOSTATINA-DOMÍNIO BH3 DAS PROTEÍNAS PRÓ-APOPTÓTICAS PUMA E BIM**

Natan Versati da Silva

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Profa. Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

Versão Corrigida

São Paulo
2015

**PRODUÇÃO E ESTUDO DE ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DE PROTEÍNAS DE FUSÃO
ENDOSTATINA-DOMÍNIO BH3 DAS PROTEÍNAS PRÓ-APOPTÓTICAS PUMA E BIM**

Orientador: Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

Aluno: Natan Versati da Silva

Nível: Mestrado

RESUMO

A endostatina (ES) é uma proteína inibidora da angiogênese, com ação específica sobre células endoteliais em proliferação, utilizada para tratamento de tumores sólidos. No entanto, o elevado efeito antitumoral da ES observado em animais não é reproduzido em humanos. Com o intuito de potencializar a eficácia terapêutica da ES, produzimos duas proteínas híbridas com dois domínios funcionais. O primeiro domínio é a ES, que apresenta especificidade por células endoteliais ativadas, dirigindo estas proteínas de fusão às células endoteliais em proliferação, promovendo sua internalização e seu efeito inibitório. Como segundo domínio funcional utilizamos os domínios BH3 pró-apoptóticos de duas proteínas BH3-only com o objetivo de promover a liberação de citocromo C e desencadear o processo de apoptose, aumentando a ação antiangiogênica da ES. Neste trabalho, foram desenhadas duas proteínas de fusão que contêm o domínio BH3 das potentes proteínas pró apoptóticas PUMA e BIM (ES-PUMA e ES-BIM), que deveriam apresentar efeito antiangiogênico potencializado em relação à ES selvagem. A inserção dos fragmentos de DNA codificantes para os domínios BH3 de PUMA e BIM no vetor contendo o gene da ES (pET-ES) foram realizadas por mutagênese sítio-dirigida. Estas proteínas de fusão recombinantes foram expressas como corpos de inclusão em *E.coli*, renaturadas utilizando processo que utiliza alta pressão e purificadas em resina de afinidade por heparina. O tratamento de células endoteliais com as proteínas ES-PUMA e ES-BIM não levou à queda de viabilidade em ensaio de MTS ou de apoptose avaliado por citometria de fluxo, em comparação com os resultados obtidos pelo tratamento com ES.

Palavras-chave: biotecnologia, biologia molecular, endostatina, antiangiogênese, clonagem molecular, apoptose.

Endereços eletrônicos: n.vst@hotmail.com; lmorganti@ipen.br

Abstract

Endostatin (ES) is an angiogenesis inhibitor protein, with specific effect on proliferating endothelial cells, used to treat solid tumors. However, the high antitumor effect observed in animals is not reproduced in humans. In order to enhance the therapeutic efficacy of ES, we produced two hybrid proteins with two functional domains. The first domain is the ES that is specific for activated endothelial cells, directing the fusion proteins to endothelial cells in proliferation, promoting the internalization and the inhibitory effect. As a second functional domain we used the pro-apoptotic BH3 domains of two BH3-only proteins in order to promote the release of cytochrome C and trigger the apoptosis process, increasing the ES antiangiogenic action. In this work, we produced two fusion proteins containing the BH3 domain of the potent pro-apoptotic proteins BIM and PUMA (PUMA-ES and ES-BIM), which should provide enhanced antiangiogenic effect in relation to ES. The insertion of DNA fragments coding for the BH3 domain and PUMA and BIM in a vector containing ES gene (pET-ES) was accomplished by site-directed mutagenesis. These recombinant fusion proteins were expressed as inclusion bodies in *E. coli*, refolded using process at high pressure and purified on heparin affinity resin. Treatment of endothelial cells with ES-PUMA and ES-BIM did not lead to loss in viability in MTS assay or increase of apoptosis evaluated by flow cytometry, in comparison with the results obtained by treatment with ES.

Key-words: Biotechnology, molecular biology, endostatin, angiogenesis, apoptosis, cloning

Electronic addresses: n.vst@hotmail.com; lmorganti@ipen.br

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela sorte, força e perseverança que me deu para chegar até o fim desse estudo.

Aos meus pais que são minha mãe e minha avó, Célia e Joana. Pelo apoio, paciência e suporte que me mantiveram ao longo desses anos não somente nessa fase, mas em todas as outras que já passei em minha vida.

Ao meu porto seguro, Gabrielle, por estar ao meu lado, me assistir treinando diversas vezes para diversos seminários e nunca reclamar. Por me ouvir diversas vezes sobre as coisas do cotidiano do mestrado, ensaios e experimentos. Por vir comigo ao IPEN aos sábados e aos domingos e ficar me esperando na portaria enquanto eu trocava o meio de cultura celular. Por tantos outros motivos que eu nunca esquecerei e serei eternamente grato.

À Dra. Ligia Morganti, pela orientação, paciência e acima de tudo por me aceitar como orientando. Apesar dos altos e baixos da pesquisa, vivi e aprendi coisas que levarei pra sempre comigo.

Ao Dr. Daniel Perez por toda disposição em me ajudar sempre que necessário com o citômetro de fluxo, além de tantas outras dicas e conhecimentos que levarei sempre em minha vida profissional.

Às ICs Cláudia, Carol e Letícia, por todo apoio no laboratório, todas as risadas e muitas vezes desabafos.

À Cleide, pelas conversas, risadas, conselhos e caronas.

Ao Dr. Patrick Spencer, pelas dicas sobre biologia molecular e empréstimos de reagentes.

À Dra. Regina Affonso, pela ajuda na parte de biologia molecular, empréstimos de reagentes e pelas vezes que me permitiu utilizar seu laboratório e seu PCR.

À Dra. Maria Helena Bellini, pela ajuda em biologia molecular e empréstimos de reagentes e disponibilização de equipamentos.

Aos funcionários e técnicos do IPEN, Neide, Junqueira, Johnny, Zé Maria e em especial para a Miriam, que me ajudou muito desde leituras em ELISA a empréstimos de enzimas de digestão.

Aos amigos do IPEN, Flávio, Carol (Autarquia), Ary, Mariana.

Aos amigos da USP, Felipe, Rui, Henrique (Bagreleta).

Aos amigos da vida, David, Deni, Ivan (nigga).

Em especial à Dra. Rosa Maria Chura Chambi, por me ajudar muito com experimentos e ensaios. Não só pela ajuda no laboratório, mas também pela motivação. Nunca ouvi um “não” ou um “depois” quando precisei de ajuda. Sempre disposta a ajudar e ensinar, praticamente me coorintou. Desejo-te toda sorte, e sucesso do mundo não só porque você me ajudou, mas porque você merece.

Ao CNPq pela ajuda financeira.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ANGIOGÊNESE.....	1
1.2. ENDOSTATINA.....	6
1.3. PROTEÍNAS DO DOMÍNIO BH ₃ E A FAMÍLIA BCL-2.....	10
1.4. JUSTIFICATIVA	15
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. MATERIAIS.....	16
3.1.1. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS PRINCIPAIS	16
3.1.2. REAGENTES PRINCIPAIS UTILIZADOS EM BIOLOGIA MOLECULAR.....	17
3.1.3. VETOR PLASMÍDICO.....	18
3.1.4. LINHAGEM CELULAR.....	18
3.1.5. PRINCIPAIS REAGENTES NA CULTURA CELULAR.....	18
3.1.6. OUTROS.....	18
3.2. MÉTODOS	19
3.2.1. CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO	19
3.2.1.1. DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA	19
3.2.2. OBTENÇÃO DE DNA DE FITA SIMPLES DO VETOR pET28-ES	21
3.2.3. MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA.....	22
3.2.3.1. SELEÇÃO DOS CLONES	22
3.2.4. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS E ISOLAMENTO DE CORPOS DE INCLUSÃO.....	23
3.2.5. RENATURAÇÃO UTILIZANDO ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (APH)	24
3.2.6. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	24
3.2.7. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RENATURADAS	25
3.2.7.1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	25
3.2.7.2. DOSAGEM DAS PROTEÍNAS.....	25
3.2.8. ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO	26

3.2.8.1. VIABILIDADE CELULAR	26
3.2.8.2. CITOMETRIA DE FLUXO	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO	28
4.2. EXPRESSÃO DA ENDOSTATINA E DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	29
4.3. RENATURAÇÃO UTILIZANDO APH	30
4.4. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS	31
4.5. VIABILIDADE CELULAR.....	33
4.6. CITOMETRIA DE FLUXO	37
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. ANGIOGÊNESE

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir do endotélio vascular pré-existente. A angiogênese normalmente ocorre durante o desenvolvimento, mas em adultos ela está envolvida na regeneração de tecidos e em processos inflamatórios crônicos (Carmeliet e Jain, 2011; Shojaei, 2012).

A importância da angiogênese está baseada no fato de que este se trata de um processo chave numa série de eventos fisiológicos como ovulação, formação do corpo lúteo e também na cicatrização de feridas. Além disso, a angiogênese está envolvida nos processos patológicos de doenças como artropatias crônicas, psoríase, retinopatia proliferativa diabética, crescimento tumoral e disseminação metastásica. Assim, todos os mecanismos que participam na angiogênese podem se tornar alvos promissores de terapia para tratamento deste grupo de doenças chamadas angiogênese-dependentes (González, Leyva *et al.*, 2000).

O controle da angiogênese se dá por um balanço entre moléculas pró-angiogênicas e antiangiogênicas. Angiogênese exacerbada ou deficiente são condições patológicas resultantes de alterações neste balanço. No caso do desequilíbrio em favor da angiogênese exacerbada, a ocorrência de eventos pró-angiogênicos leva ao crescimento de novos vasos que acabam sustentando o crescimento de células tumorais adjacentes ou marginais (Bergers e Benjamin, 2003; Carmeliet e Jain, 2011). Existem diferenças entre a angiogênese fisiológica e a angiogênese tumoral (figura 1). Esta última que tem por características, estrutura vascular aberrante, fluxo sanguíneo anormal, incremento da permeabilidade e maturação demorada (figura 2) (Weis e Cheresh, 2011).

A angiogênese tumoral é caracterizada pela liberação de fatores pró-angiogênicos, pelas próprias células tumorais ou por células inflamatórias em resposta a hipóxia, stress mecânico, liberação de proteínas inflamatórias, entre outros estímulos. Destes fatores pró-angiogênicos os mais conhecidos são o fator de crescimento de fibroblasto (aFGF na forma ácida, ou na básica como bFGF) (Folkman, 2006; Potente, Gerhardt *et al.*, 2011) e o fator de crescimento de células endoteliais (VEGF) os quais possuem ação indutora de mitose sobre as células endoteliais (Shahi e Pineda, 2008). A hipóxia de células tumorais é capaz de induzir o aumento de expressão de fatores angiogênicos, promovendo assim a neovascularização no microambiente tumoral (Shweiki, Itin *et al.*, 1992; Jain, 2005; Weis e Cheresh, 2011).

O fato de que o crescimento tumoral e a metástase são dependentes da angiogênese foi demonstrado já há muito tempo. Experimentos realizados por Greenblatt e Shubi (1968) já demonstraram em 1968 que o transplante de células de melanoma ou coriocarcinoma, promovem o crescimento e proliferação de vasos sanguíneos mesmo quando um filtro é interposto entre o hospedeiro e o tumor. Isto prova que a angiogênese tumoral é mediada por fatores difusíveis (Otrock, Mahfouz *et al.*, 2007).

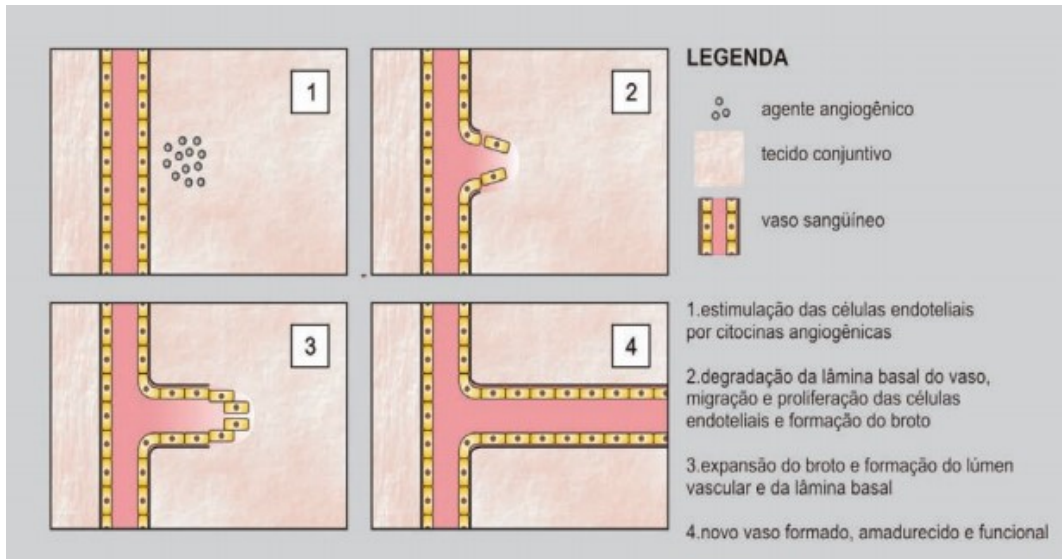


Figura 1: Representação esquemática da angiogênese fisiológica. (Da Silva, Butera *et al.*, 2007; Song, Ding *et al.*, 2012).

Várias evidências sugerem que a angiogênese é essencial para o crescimento e sobrevivência de tumores sólidos e suas metástases (Folkman, 1990; Hori, Sasada *et al.*, 1991; Kim, Li *et al.*, 1993; Millauer, Shawver *et al.*, 1994). Em um estágio pré-vascular tumores sólidos raramente crescem mais do que 2 a 3 mm e podem conter alguns milhões de células. As células de tumores pré-vasculares podem proliferar tão rapidamente quanto aquelas de um tumor em expansão, no entanto, a taxa de crescimento de células em tumores sem neovascularização fica em equilíbrio com a sua taxa de mortalidade. Uma vez que o tumor se torna vascularizado, ele cresce exponencialmente. A infiltração de novos vasos sanguíneos supre as células tumorais de oxigênio e nutrientes, além de remover os produtos do seu metabolismo. (Folkman, 1990). (Potente, Gerhardt *et al.*, 2011).

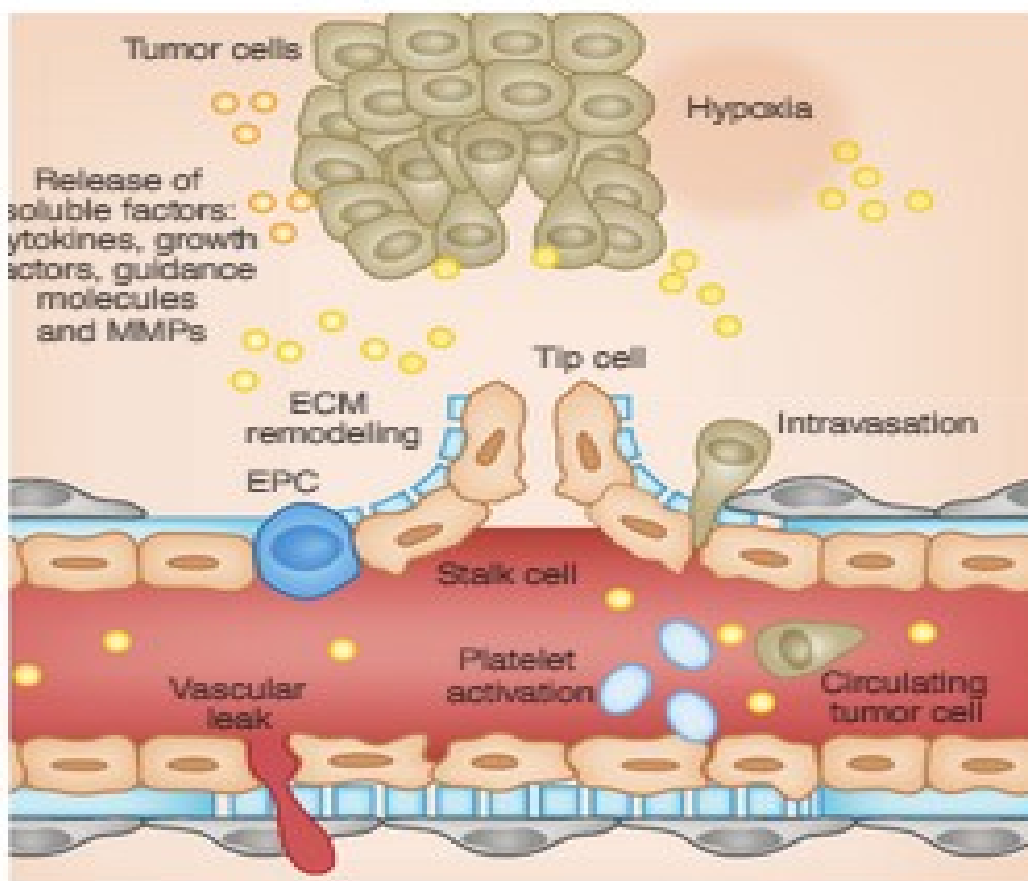


Figura 2: Representação esquemática da angiogênese tumoral. Origens de neovascularização induzida por tumores. A combinação de estímulos presentes no microambiente tumoral promove mudanças nos diversos tipos celulares adjacentes, promovendo assim a migração vascular (Weis e Cheresh, 2011).

A indução e manutenção de neoangiogênese tumoral são atribuídas em grande parte à produção de fatores de crescimento promotores da angiogênese por células tumorais. A liberação desses fatores angiogênicos é o resultado final de mutações genéticas dentro da célula tumoral. Um exemplo é a mutação do gene supressor tumoral P53. A proteína P53 normal codifica a secreção do trombospondina-1, um inibidor da angiogênese. Mutações do gene p53 promove uma diminuição de RNA mensageiro de Trombospondina-1 além do aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular celular, um poderoso fator angiogênico. O grau de angiogênese varia entre os tipos de tumores com alguns tumores demonstrando maior neovascularização que outros (Miles, 1999; Chung, Lee *et al.*, 2010; Follis, Chipuk *et al.*, 2013).

Estudos experimentais indicam que a supressão da angiogênese pode inibir a progressão tumoral e metástases. Muitas linhas de investigação implicam integrinas, que são reguladores-chave da migração de células endoteliais e de sobrevivência, tal como os reguladores-chave da angiogênese tumoral (Avraamides, Garmy-Susini *et al.*, 2008).

É importante lembrar que a angiogênese não está envolvida apenas no desenvolvimento e disseminação dos tumores, mas também em vários processos fisiológicos e outros patológicos. Ela é essencial no desenvolvimento dos órgãos, na cura de ferimentos e em processos inflamatórios, sendo rigorosamente regulada pelo organismo. A angiogênese também está envolvida em doenças como artrite reumatoide e na retinopatia diabética (Da Silva, Butera *et al.*, 2007).

Tendo em vista a necessidade da angiogênese para o crescimento tumoral, é possível afirmar que a sua inibição pode potencialmente prevenir o crescimento e progressão tumoral, assim como de suas metástases. Vários inibidores de angiogênese vêm sendo estudados, particularmente com o objetivo de atuarem em células endoteliais vasculares, tendo como alvo fatores angiogênicos como o VEGF, $TGF\alpha$, Ang1, PAI-1. Outra abordagem é a utilização de agentes inibidores de angiogênese, como a trombospodina-1, angiostatina e a ES (O'reilly, Boehm *et al.*, 1997; Fukumura e Jain, 2007; Matsumoto, Hirohata *et al.*, 2014). A abordagem de utilizar células que suprimem o crescimento tumoral como alvo, ao invés das células tumorais propriamente ditas é promissora uma vez que estas células possuem um comportamento genético mais estável, sendo assim menos suscetíveis a desenvolverem resistências às drogas e, além disso, apresenta outras vantagens frente à quimioterapia comum, como baixa toxicidade, amplo espectro de atividade e baixo risco de desenvolvimento de resistência por parte das células (Bisacchi, Benelli *et al.*, 2003). Dentre os inibidores mais promissores de angiogênese endógeno, que vem sendo estudado e utilizado no tratamento de tumores sólidos em humanos é a ES (Karamouzis e Moschos, 2009).

1.2. Endostatina (ES)

A ES é um fragmento de 20 kDa da porção C-terminal do colágeno XVIII que mostra potente inibição de migração de células endoteliais (Xu, Tan *et al.*, 2008; Fu, Tang *et al.*, 2009). Esta proteína foi primeiramente descrita por O'Reilly *et al* em 1997, isolada de células hemangioendotelioma (EOMA) murino e tem mostrado ser um inibidor de angiogênese e crescimento tumoral em camundongos (Xu, Tan *et al.*, 2008; Sunshine, Dallabrida *et al.*, 2012).

Como descrito em Hohenester (1998), a ES é um fragmento de 184 amino ácidos do colágeno XVIII, 42% dos quais são amino ácidos hidrofóbicos. Esta proteína contém ainda, 16 amino ácidos de caráter ácido, 29 aminoácidos de caráter básico e quatro cisteínas que formam duas pontes dissulfídicas, Cys33-Cys173 e Cys135-Cys165. A estrutura da ES, determinada por meio de cristalografia a 1,5 Å contém a presença de folhas β , loops e duas α -hélices (Figura 3) (Hohenester, Sasaki *et al.*, 1998; Xu, Tan *et al.*, 2008).

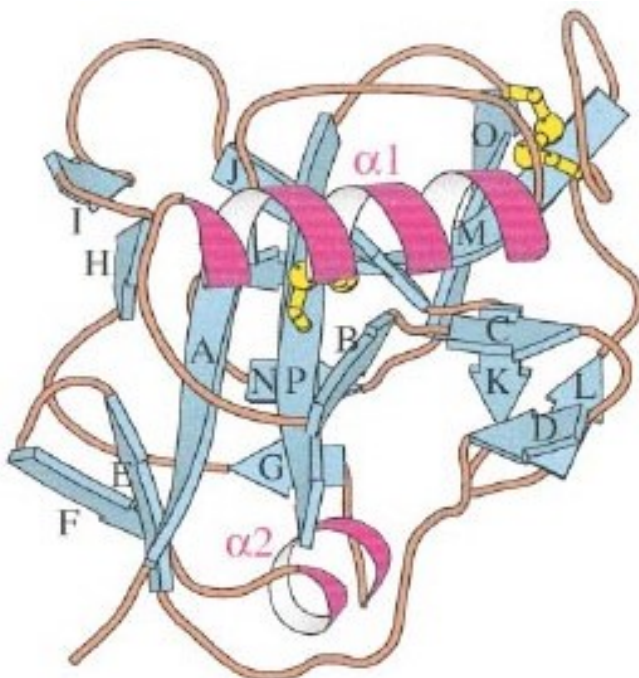


Figura 3: Representação da estrutura da ES (Hohenester, Sasaki *et al.*, 1998).

A ES chamou a atenção na área médica quando sua capacidade de inibir tumores sólidos *in vivo* foi evidenciada, afetando a formação de vasos sanguíneos, assim inibindo indiretamente o crescimento tumoral de

camundongos. Passou então a ser considerada um agente com importante potencial terapêutico por sua ação como um potente inibidor de angiogênese e de desenvolvimento e progressão tumoral (O'reilly, Boehm *et al.*, 1997; Xu, Tan *et al.*, 2008). Ciclos repetitivos de ES administrada em camundongos portadores de tumores subcutâneos de diferentes tipos celulares, não produziram resistência ao tratamento, mesmo com um longo período de tratamento. O tratamento com ES então, tem sido correlacionado à ação antiangiogênica em modelos animais, sem efeitos colaterais, toxicidade ou resistência (Boehm, Folkman *et al.*, 1997; O'reilly, Boehm *et al.*, 1997).

Os mecanismos moleculares da ação ES na inibição da angiogênese e do crescimento tumoral ainda não são claramente conhecidos. Muitos estudos têm demonstrado que os mecanismos não vêm a ser resultado de uma ação molecular individual, mas sim, de reações complexas. Em nível celular, foi reportado que a ES induz a apoptose de células endoteliais, além de inibir sua proliferação e migração. Estudos em animais demonstram que a ES inibe fortemente o crescimento de vários tumores murinos e xenotransplantados de humanos, por suprimir a neovascularização (Xu, Tan *et al.*, 2008; Wang, Lu *et al.*, 2015).

A bioatividade da ES, entretanto, é atribuída preferencialmente à receptores de superfície de membrana. Proteínas como as integrinas, tropomiosina, laminina e a metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) tem sido indicadas como receptores com diferentes afinidades de ligação. (Javaherian, Park *et al.*, 2002; Kim, Hwang *et al.*, 2002; Sudhakar, Sugimoto *et al.*, 2003). Foi também demonstrado que a internalização da ES em células endoteliais ativas, é realizada por meio da ligação à nucleolina, proteína que atua como um receptor específico e com alta afinidade. (Ginisty, Sicard *et al.*, 1999; Folkman, 2007; Shi, H. B., Huang, Y. J. *et al.*, 2007). A nucleolina media a internalização da ES, sendo assim translocada até o interior celular pelo complexo nucleolina/uPAR/integrina $\alpha 5\beta 1$ e posteriormente para o núcleo celular pelas integrinas $\alpha 1$ e $\beta 1$ (Figura 4) (Song, Ding *et al.*, 2012; Holstein, Karabin-Kehl *et al.*, 2013).

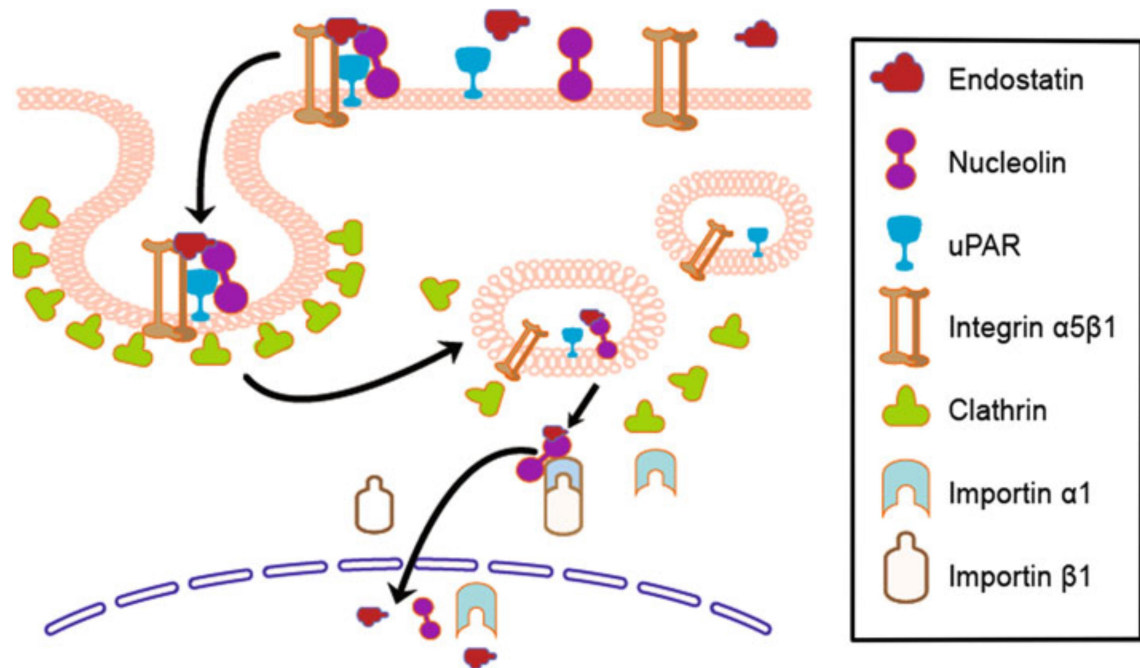


Figura 4: Representação esquemática da internalização (endocitose) da ES via complexo nucleolina/uPAR/integrina $\alpha 5\beta 1$. A ligação da ES na superfície das células endoteliais, se dá devido às proteínas nucleolina, integrina, $\alpha 5\beta 1$ e uPAR formando um complexo receptor que promove a internalização da endostatina. Uma vez dentro da célula, $\alpha 5\beta 1$, integrina e uPAR são em seguida recicladas de volta para a superfície celular ou degradadas, enquanto a nucleolina se associa com a importina adaptadora $\alpha 1\beta 1$, transportando a ES para o núcleo (Song, Ding *et al.*, 2012).

A ES também atua reduzindo a expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl2 e Bcl- χ_L , bem como de fatores de crescimento associados (Shichiri e Hirata, 2001; Matsumoto, Hirohata *et al.*, 2014). Além disso, a ES induz ativação de caspase-3, proteína intracelular que atua na apoptose (Chura-Chambi, Bellini *et al.*, 2014) e atua inibindo a produção de c-myc, proteína necessária para a migração de células endoteliais ativas (Shichiri e Hirata, 2001; Guo, Yao *et al.*, 2015) e da ciclina-D, levando à parada de células endoteliais (Lim, Duong *et al.*, 2013; Lee, Jeung *et al.*, 2015).

É importante ressaltar, porém, que apesar da ES ter ação em diversas linhagens de células de origem endotelial em proliferação, esta mesma ação não ocorre em células de outras origens (O'reilly, Boehm *et al.*, 1997; Dixelius, Larsson *et al.*, 2000), ou em células endoteliais em estado de quiescência (Shi, H., Huang, Y. *et al.*, 2007; Song, Ding *et al.*, 2012). A especificidade da ação da ES por células endoteliais ativadas é importante, pois uma vez internalizada, resulta em ação biológica de diminuição de migração celular e apoptose, cujo efeito final é a inibição de angiogênese.

O estudo e análise clínica da terapêutica da ES administrada pela via intravenosa não demonstraram toxicidade significativa em pacientes tratados por períodos prolongados. A farmacocinética quanto à biodisponibilidade de ES no plasma foi linear (O'reilly, Boehm *et al.*, 1997; Kulke, Stuart *et al.*, 2006)

O tratamento de tumores e metástases utilizando a ES apresenta algumas vantagens sobre a quimioterapia convencional: o endotélio vascular é um alvo que pode ser facilmente atingido por agentes antiangiogênicos administrados sistemicamente; a ES é altamente específica para células endoteliais ativadas e em condições fisiologicamente normais. Com exceção dos órgãos reprodutores femininos, as células endoteliais não se dividem em condições fisiológicas normais; a ES possui baixa toxicidade; não causa resposta imunológica por se tratar de uma proteína endógena e apresenta ação sobre diferentes tipos de tumores, pois sua atuação é indireta sobre o endotélio tumoral e não sobre as células tumorais.

Apesar das vantagens do tratamento com esta proteína, existem restrições quanto ao seu uso: meia vida curta (duas horas), necessidade de uma administração contínua para o tratamento ser eficiente (15-600mg/m²/dia ou aproximadamente 1,4g) (Karamouzis e Moschos, 2009) e necessidade de ajuste de doses (Celik, Surucu *et al.*, 2005). No entanto, o mais importante obstáculo para o uso da ES, é o pequeno efeito antitumoral observado em ensaios clínicos em humanos (Thomas, Arzoomanian *et al.*, 2003).

1.3. PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2

Apoptose ou morte celular programada é uma forma fisiológica de morte celular, a qual faz parte importante na embriogênese, homeostasia celular e atrofia tecidual (Gupta, 2005) (Figura 5). A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas que encerram o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos (Grivicich, Regner *et al.*, 2007).

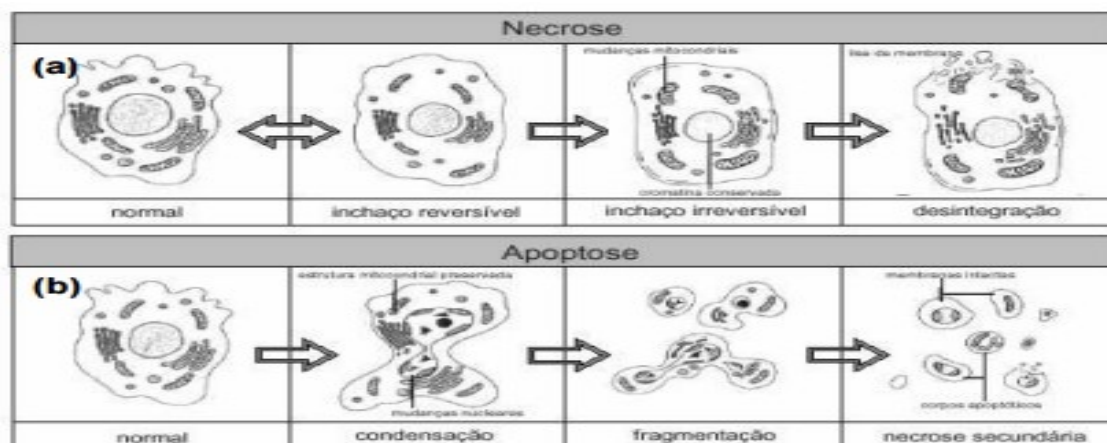


Figura 5: Representação esquemática e diferenciação do processo necrótico e apoptótico. **(a):** Necrose, caracterizada pela perda de integridade de membrana plasmática, floculação da cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas. **(b):** Apoptose envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas (Anazetti e Melo, 2007).

Entre as moléculas envolvidas no controle das diferentes vias de apoptose podemos citar as proteínas anti-apoptóticas e as pró-apoptóticas da família BCL2 de proteínas, além das caspases e pró-caspases (Happo, Strasser *et al.*, 2012). Diferentes estímulos podem desencadear a apoptose: danos ao DNA, agentes quimioterápicos, baixas quantidades de oxigênio e nutrientes e choque térmico (Wei, Zong *et al.*, 2001). O processo apoptótico pode ser iniciado pela via intrínseca ou mitocondrial e a pela via extrínseca ou citoplasmática (Grivicich, Regner *et al.*, 2007). A via extrínseca é assim conhecida pelo fato de ser estimulada por fatores extracelulares e é desencadeada pela interação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da família dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF) (Figura 6). Todos os membros da família rTNF entre eles FasL e Fas, possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. A ligação de fatores ao rTNF resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos. Uma vez que os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/ MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, promovendo a morte celular por apoptose (Grivicich, Regner *et al.*, 2007; Fletcher, Meusburger *et al.*, 2008).

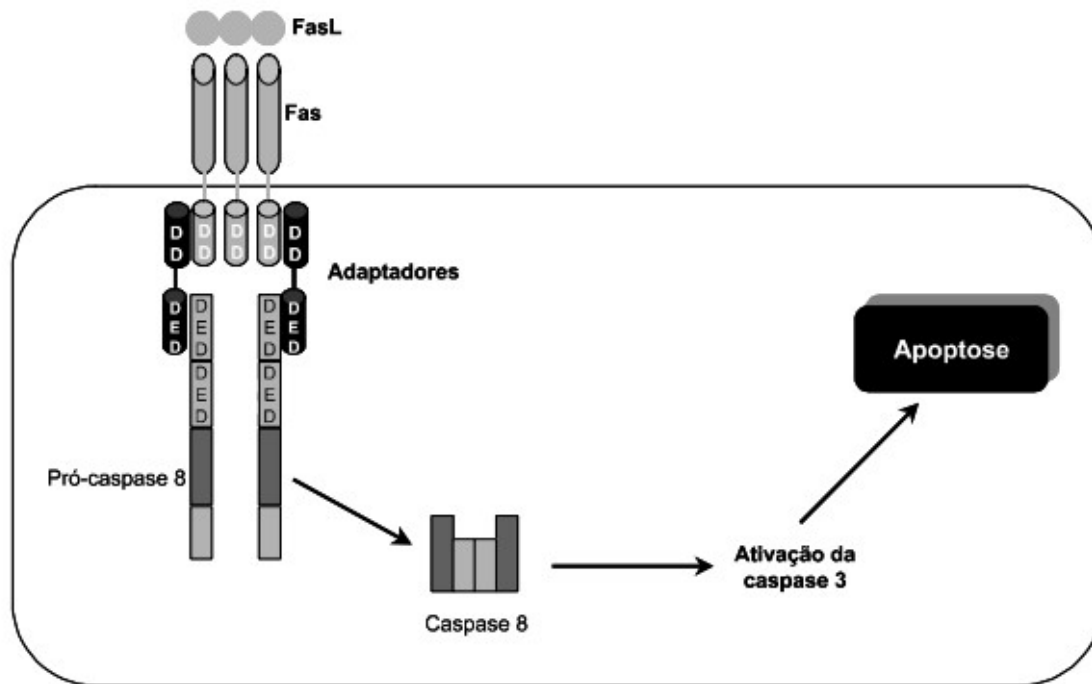


Figura 6: Representação esquemática da via extrínseca apoptótica, onde DD = domínio de morte; DED = efector do domínio de morte; FasL e Fas = membros da superfamília rTNF. (Grivicich, Regner *et al.*, 2007).

A via intrínseca ou mitocondrial (Figura 7) é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria. Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular que induzem a permeabilização mitocondrial com consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (Grivicich, Regner *et al.*, 2007; Happo, Strasser *et al.*, 2012).

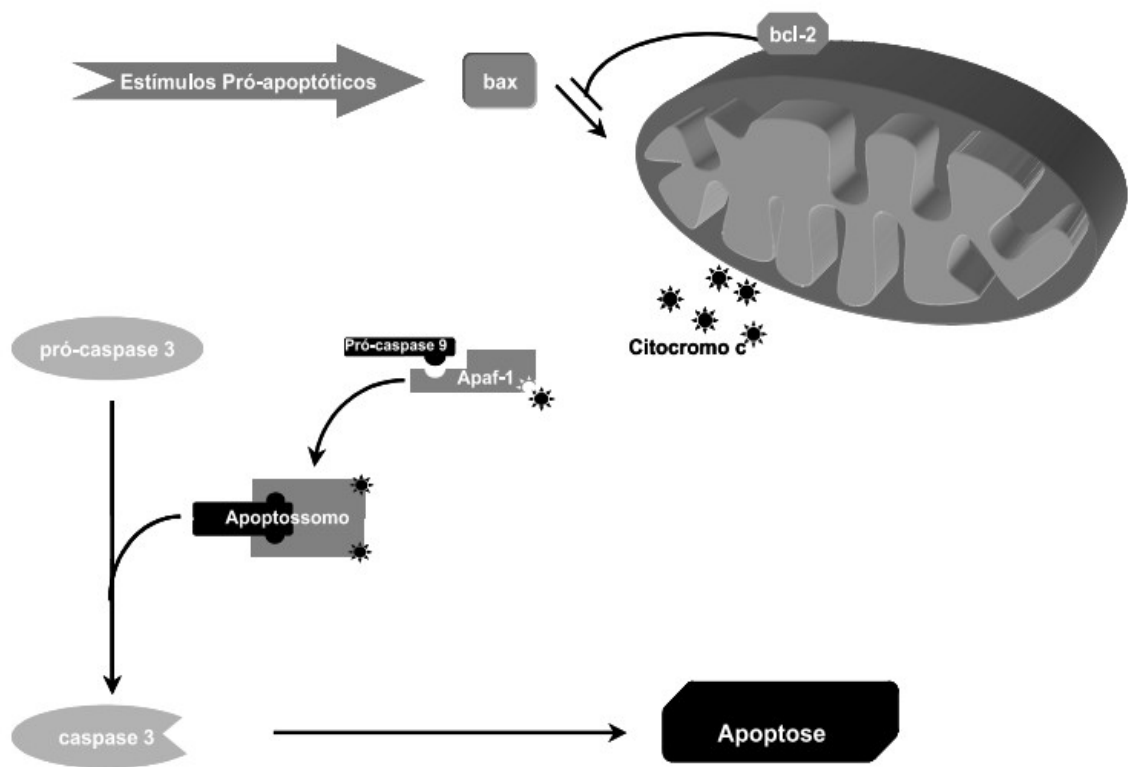


Figura 7: Representação esquemática da via intrínseca de apoptose, onde Apaf-1 = fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (Grivicich, Regner *et al.*, 2007).

A família BCL-2 de proteínas é constituída por reguladores da via intrínseca da apoptose (Amarante-Mendes e Green, 1999; Cory e Adams, 2002). Enquanto alguns membros possuem ação pró-apoptótica, outros membros possuem ação inversa, pró-sobrevida das células. Os membros BCL-2 podem ser divididos em três principais subclasses definidas pela homologia entre quatro regiões conservadas. Estas regiões, denominadas de domínios de homologia (BH) de 1 a 4 correspondem à α -hélices com similaridade de sequência que ditam a estrutura e função das proteínas. Os membros anti-apoptóticos BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 e A1 contém três ou quarto domínios BH. Os efetores da apoptose BAX e BAK são parentes que possuem estruturas nos domínios BH1 a BH3 que se assemelham aos parentes pró-sobrevida (Suzuki, Youle *et al.*, 2000; Moldoveanu, Liu *et al.*, 2006). As proteínas relacionadas “BH3-only” também possuem ação pró-apoptótica e se assemelham aos outros membros somente pelo pequeno domínio BH3, o qual é essencial para a sua função de morte (Huang e Strasser, 2000; Willis e Adams, 2005; Juin, Geneste *et al.*, 2013).

A mudança de estado na célula ocorre pelas interações entre as proteínas das subfamílias. A estrutura da proteína pró-sobrevida BCL-XL revelou que os seus domínios BH1, BH2 e BH3 estão em alta proximidade e criam uma cavidade hidrofóbica capaz de acomodar o domínio BH3 do membro pró-apoptótico BAK (Sattler, Liang *et al.*, 1997; Juin, Geneste *et al.*, 2013). Em células viáveis as proteínas BAX e BAK existem como monômeros inativos. O BAX inativo reside no citosol ou é fracamente associado a membranas e a cavidade hidrofóbica é ocupada pela sua α -hélice 9 (Suzuki, Youle *et al.*, 2000). Após o recebimento de um sinal de morte por uma α -hélice BH3, a BAX expõe o seu domínio BH3 e se transforma em um monômero ativado, que é capaz de propagar a sua ativação (Gavathiotis, Reyna *et al.*, 2010). O BAX ativado se transloca para a mitocôndria e forma homo-oligômeros que promovem a formação de poros, o que danifica irreversivelmente as mitocôndrias (Wei, Zong *et al.*, 2001) e promove a liberação de fatores pró-angiogênicos, que resultam na ativação das caspases executoras de apoptose (Kluck, Bossy-Wetzels *et al.*, 1997; Green e Kroemer, 2004).

O domínio BH3 de BAX confere a sua funcionalidade de morte e foi mostrado que a porção mínima de BAK crítica para a sua heterodimerização e função pró-apoptótica é a região de 15 a 16 aminoácidos do domínio BH3 (Sattler, Liang *et al.*, 1997; Huang e Strasser, 2000; Shangary, Oliver *et al.*, 2004). A apoptose também pode ser induzida pela ação do domínio pró-apoptótico das proteínas "BH3-only". Dentre essas proteínas as mais potentes são a PUMA e a BIM (Chen, Willis *et al.*, 2005; Yu e Zhang, 2008). A ação das proteínas BH3-only, o modelo direto, em que os membros BH3-only seriam capazes de iniciar a apoptose pela ligação direta com os mediadores essenciais para a morte celular BAX e BAK e o modelo indireto, em que a ativação das proteínas efetoras de apoptose BAX e BAK se daria de forma indireta. As proteínas BH3-only se ligariam aos parentes anti-apoptóticos (BCL-2, BCL-XL, MCL 1) que restringem BAX e BAK. Neste cenário BIM e PUMA são altamente potentes porque eles ocupam todas as proteínas pró-sobrevida que restringem a ação apoptótica de BAX e BAK (Willis, Fletcher *et al.*, 2007).

O desequilíbrio a favor da inibição de apoptose é uma etapa crítica no desenvolvimento de tumores. A presença de níveis elevados dos membros

anti-apoptóticos da família de proteínas BCL-2 ou, alternativamente, a perda ou inativação dos membros pró-apoptóticos são frequentemente encontrados em câncer (Deng, Carlson *et al.*, 2007), o que possibilita a viabilidade destas células em condições que levariam as células normais à morte por apoptose. Assim sendo, estratégias têm sido desenvolvidas a fim de induzir eventos apoptóticos capazes de superar a inibição de apoptose em células tumorais, tanto pela liberação de peptídeos BH3 pró-apoptóticos (Azar e Lorberbourn-Galski, 2000; Li, Boehm *et al.*, 2007) quanto pela utilização de compostos que são capazes de penetrar nas células e agem como pequenas moléculas que mimetizam o domínio BH3 pró-apoptótico (Van Delft, Wei *et al.*, 2006; Dai, Pang *et al.*, 2014). No entanto, existe preocupação com relação ao uso terapêutico dessas moléculas devido à falta de especificidade para as células tumorais, possivelmente levando à maior toxicidade para as células não tumorais (Happo, Strasser *et al.*, 2012).

1.4. JUSTIFICATIVA

Em 2013 foi publicado um artigo, fruto do doutorado da Dra. Rosa Maria Chura-Chambi, do nosso grupo de pesquisa, no qual foi realizada a fusão do domínio BH3 da proteína BAX, efetora de apoptose à ES. O estudo teve como finalidade aproveitar a especificidade da ES pelas células endoteliais ativadas e aumentar a potência desta proteína como agente anti-angiogênico e anti-tumoral, pela ligação ao domínio pró-apoptótico BH3 de BAX. A proteína resultante, denominada de ES-BAX foi internalizada pelas células endoteliais em proliferação e se mostrou mais eficiente do que a ES em promover a morte destas células e de impedir sua migração. Além disso, o tratamento de camundongos com tumores renais utilizando a ES-BAX reduziu o tamanho dos tumores em 86,9% na comparação com o tamanho dos tumores dos animais tratados com ES e em 93,3% na comparação com os tumores dos animais não tratados (Chura-Chambi, Bellini *et al.*, 2014). Tendo em vista o bom resultado obtido com a fusão da ES ao domínio BH3 da proteína BAX, acreditamos que seria possível que o efeito antiangiogênico pudesse ser amplificado pela elevação intracelular dos níveis dos domínios BH3 das proteínas pró-

apoptóticas BH3-only PUMA e BIM, as quais possivelmente apresentam ação apoptótica indireta, pela inibição de todos os parentes pró-sobrevida celular que restringem BAX e BAK. Uma vez internalizadas com sucesso, sequências correspondentes ao domínio BH3 das proteínas pró-apoptóticas PUMA e BIM, em fusão com a proteína ES, induziriam a morte celular nas células endoteliais ativas. Assim, a ES agregaria sua seletividade e sensibilidade por células endoteliais ativas, exerceria sua já comprovada ação anti-angiogênica, porém, com propriedade apoptótica potencializada.

2. OBJETIVOS

Produzir proteínas recombinantes ES em fusão com o domínio BH3 das potentes proteínas pró-apoptóticas “BH-only” PUMA e BIM.

Verificar a atividade apoptótica dos híbridos *in vitro* em células de origem endotelial em comparação com o tratamento utilizando a **ES** selvagem.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS PRINCIPAIS

- Aparelho Milli-Q Plus, Purificador de água, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.
- Autoclave, Kavoklave II, Blackburn, Inglaterra.
- Banho-maria, modelo 100, Fanem, São Paulo, Brasil.
- Balança analítica, modelo AW 220, Shimadzu, Japão.
- Centrífuga refrigerada automática, modelo 5818, Eppendorf, Alemanha.
- Eletroporador, modelo II, Invitrogen, San Diego, CA, E.U.A.
- Estufa de cultura celular, modelo 3158, Farma Scientific, Ohio, E.U.A.
- Espectrofotômetro, Ultrospec III, Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.

- Fluxo laminar, modelo 2256, TROX, Curitiba, Brasil.
- Incubadora refrigerada com agitação, modelo TE421, Tecnal, Brasil.
- Leitor de ELISA, modelo MR 400, Dynatech Biotech, E.U.A.
- Microscópio invertido, Nikon, Modelo TMS, Japão.
- Sistema de estocagem de criotubos em nitrogênio líquido, Thermolyne, Dubuque, IA, E.U.A.
- Sistema de eletroforese vertical, modelo SE250, Hoefer, Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, E.U.A.
- Sistema de eletroforese horizontal, modelo EPS 500/400, Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.
- Sistema de alta pressão, HiP, Pennsylvania, E.U.A.
- Sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.
- Transiluminador, modelo Macrouve, Hoefer, San Francisco, E.U.A.
- Citometro de fluxo, Accuri C6,BD.

3.1.2. REAGENTES PRINCIPAIS UTILIZADOS EM BIOLOGIA MOLECULAR

- Agarose, Gibco-BRL, Grand Island, NY, E.U.A.
- Kanamicina, Sigma Chemical, Steinheim, Alemanha.
- Agar-agar purificado para bacteriologia, Merck, São Paulo, Brasil.
- Bacto-Triptona, Difco, São Paulo, Brasil.
- Enzimas de restrição e tampões respectivos , Promega, Madison, E.U.A.
- Extrato de levedura, Difco, São Paulo, Brasil.
- Fragmento Klenow da DNA polimerase I, Amersham Pharmacia, Biotech.
- Marcador de tamanho de pares de base: DNA Lambda digerido com *Eco RI*, *Hind III*, Sigma Chemical, Steinheim, Alemanha.

3.1.3. VETOR PLASMÍDICO

- pET 28 a+, N° Cat. 69739-3, (66864-3), Novagen, Madison, E.U.A.

3.1.4. LINHAGEM CELULAR

- Células C-PAE (linhagem celular vascular de artéria de bezerro), ATCC, Manassas, VA, E.U.A. (CCL-209)

3.1.5. PRINCIPAIS REAGENTES NA CULTURA CELULAR

- Antibióticos e antimicóticos, Gibco-BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, E.U.A.
- Bicarbonato de sódio, Gibco-BRL, Gathersburg, MD, E.U.A.
- Dimetilssulfóxido, Merck, São Paulo, Brasil.
- HEPES, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.
- Meio EMEM (mínimo essencial *Eagle's*), Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil.
- Soro fetal bovino (SFB), Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.
- Tripsina, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.

3.1.6. OUTROS

- *E. coli* cepa DH5 α
- *E. coli* cepa HB2151
- *E. coli* cepa BL2151
- Colunas HiTrap Heparin HP, 1 mL, GE Healthcare.
- Fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), RD Systems, Minneapolis, MN, E.U.A.
- Kit para Miniprep NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel

- Material plástico estéril para cultura celular, Corning Costar Corp., Cambridge, MA, E.U.A.
- Kit para citometria de flux, BD, ANNEXIN V: FITC APOPTOSIS DETECTION KIT I.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO

O vetor utilizado para a mutagênese sítio-dirigida foi o pET28-ES que contém a sequência de aminoácidos codificantes do gene da ES murina. Com o intuito de produzir proteínas de fusão ES com domínio BH3 de proteínas pró-apoptóticas, os oligonucleotídeos contendo as sequências codificantes do domínio BH3 destas proteínas, foram desenhados visando a sua inserção por mutagênese ao vetor pET28-ES.

3.2.1.1. DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA.

Com base nos estudos de Willis, Adams, Kelekar e Chura-Chambi (Kelekar e Thompson, 1998; Willis e Adams, 2005; Adams e Cory, 2007; Chura-Chambi, Cordeiro *et al.*, 2013), os primers utilizados na mutagênese sítio-dirigida foram desenhados para conter as sequências codificantes dos aminoácidos do domínio BH3 de maior relevância para a indução da apoptose. As sequências complementares à região final do gene da ES e a jusante no vetor foram desenhadas para flanquear as sequências dos domínios BH3 de PUMA e BIM para hibridização com estas regiões e inserção dos domínios de interesse por mutagênese. Foram ainda adicionados um códon de terminação “stop códon” e dois resíduos de glicina. Os primers adquiridos não puderam ultrapassar o número de 100 bases devido ao fato de que este limite foi imposto pelo fabricante. Deste modo, os insertos ficaram com 19 codons (57

bases) que correspondem a 17 aminoácidos do domínio de PUMA e BIM e dois resíduos de glicina nas proteínas traduzidas ES-PUMA e ES-BIM.

Considerando que a ES murina foi utilizada e que os ensaios posteriores seriam realizados em camundongos, foram escolhidas as sequências de PUMA e BIM murinas, para fusão com a ES. Com base em estudos de Chen, 2005, foram escolhidas as sequências do domínio BH3 dos peptídeos PUMA e BIM murinos (Chen, Willis *et al.*, 2005).

Os oligonucleotídeos desenhados como sequência complementar invertida da fita simples do DNA molde, no caso o pET28-ES, utilizados para o procedimento de mutagênese sítio-dirigida foram os seguintes:

ES-PUMA

5'CGACGGAGCTCGAATTCTAATACTGCGCGTTCAGATCATCCGCCATGC
GGCGCAGCTGCGCGCCAATTCGCGCGCACCACTTTGGAGAAAGAGG
TCAT 3'

ES-BIM

5'CGACGGAGCTCGAATTCTAATAGGTTTCGTTAAATTCATCGCCAATGC
GGCGCAGTTCCTGCGCAATGCGAATTCACCACTTTGGAGAAAGAGG
TCAT 3'

Preto: Sequência complementar à do vetor pET 28;

Roxo: Stop codon;

Azul: Domínio BH3 de BIM ou PUMA;

Verde: Dois resíduos de glicina;

Vermelho: Sequência complementar à da ES.

A representação da estrutura da ES e o modelo tridimensional hipotético da estrutura da proteína de fusão ES-PUMA são mostrados na figura 8, mostrando o domínio BH3 de PUMA como uma α -hélice na região C-terminal

da ES. A proteína ES-BIM teria a mesma estrutura, pois os domínios BH3 das duas proteínas BH3-only são semelhantes.

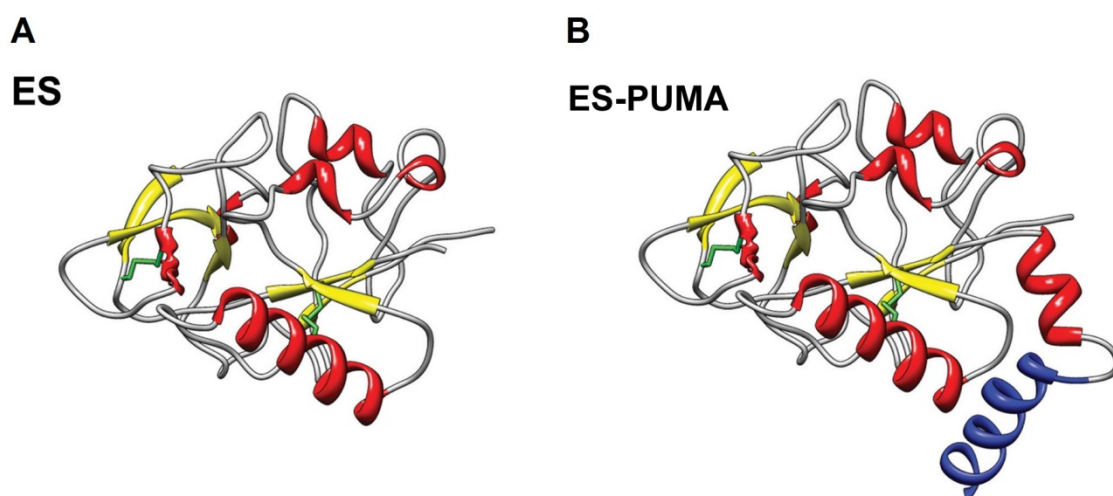


Figura 8: A, Modelo tridimensional da estrutura da ES (1KOE) mostrando as α -hélices em vermelho, as folhas beta em amarelo e as pontes dissulfídicas em verde; B, Modelo tridimensional hipotético da proteína ES-PUMA, mostrando a α -hélice do fragmento do domínio PUMA em fusão com ES. Em azul o peptídeo PUMA. Em roxo a α -hélice parte da região C-Terminal do domínio ES e o linker de glicinas. Em amarelo as folhas β e em vermelho a α -hélice da ES.

3.2.2. OBTENÇÃO DE DNA DE FITA SIMPLES DO VETOR pET28-ES

Para o procedimento de mutagênese sítio-dirigida foi utilizado o DNA de fita simples do vetor pET28-ES. Esta fita foi obtida à partir da transformação, por eletroporação, de uma cepa de *E. coli* com o epissomo F' e o genótipo du^+ e ung^- (RZ1032) competente.

Colônias recém transformadas de *E. coli* RZ1032 com o vetor pET28-ES foram transferidas para um tubo estéril contendo 1,5 mL de meio YT com 30 μ g/ μ L de canamicina e a cultura foi deixada sob agitação a 37°C até atingir absorbância de 0,2 (a 600nm). Foi adicionado, em seguida 10 μ L de cultura contendo o fago auxiliar R408 e prosseguiu-se com agitação a 37°C por 5 a 6 horas, centrifugando em seguida o material em microcentrífuga a 12000 rpm por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um outro tubo e foram adicionados 200 μ L de uma solução de polietilenoglicol (PEG) 8000 20% e NaCl 2,5M, homogeneizando e em seguida, deixando-se em repouso à temperatura

ambiente por 15 minutos. O DNA fágico foi centrifugado por 5 minutos em microcentrífuga a 12000 rpm e o precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de solução de TE. Prosseguiu-se com extração utilizando 50 μ L de fenol tamponado. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e foi adicionado 9 μ L de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 300 μ L de etanol. Após agitação, o tubo foi incubado por 15 minutos a -20°C para precipitação do DNA e em seguida, centrifugado em microcentrífuga a 12000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado lavado com etanol 70%, novamente centrifugado e seco. O DNA de fita simples obtido foi ressuspenso em 25 μ L de TE, quantificado em eletroforese em gel de agarose a 0,6% e estocado a -20°C.

3.2.3. MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA

A reação de mutagênese sítio-dirigida foi realizada seguindo-se o protocolo descrito por Kunkel (Kunkel, 1985). O anelamento dos oligonucleotídeos ao DNA molde foi realizado utilizando-se 5 μ L de DNA de fita simples de pET28-ES contendo resíduos de uracila a 1 μ M, 1 μ L de oligonucleotídeo fosforilado a 5 μ M, 1 μ L de tampão de anelamento e 3 μ L de água destilada. Esta reação foi incubada a 55°C por 5 minutos e resfriada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 4 μ L de dNTP 2,5mM em TE, 1 μ L de tampão 10x concentrado da enzima T4 DNA ligase, 1 μ L de ATP 10mM, 2 μ L de água destilada, 1 unidade (0,5 μ L) de DNA polimerase (fragmento Klenow) e 1 unidade (1 μ L) de T4 DNA ligase. A solução final foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Foi utilizado 5 μ L desta solução para transformação por eletroporação de bactérias *E. coli* HB2151 (dut+ ung+) competentes.

3.2.3.1. SELEÇÃO DOS CLONES

As células competentes *E. coli* HB2151 foram transformadas por eletroporação em cubetas adequadas. Os produtos das transformações foram adicionados à tubos estéreis contendo 1mL de meio LB e estes tubos foram

incubados sob agitação a 37°C por 1 hora. Plaqueou-se um volume de 100µL de bactérias transformadas em ágar LB contendo 30µg/mL de canamicina e as placas foram cultivadas em estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas. As colônias resistentes ao antibiótico foram repicadas em meio LB líquido contendo canamicina. Um kit comercial (Nucleospin Plasmid) foi utilizado para extração e purificação dos DNAs plasmidiais. Estes DNAs foram submetidos à digestão com as enzimas Bgl II e Xho I e submetidos à eletroforese em gel de agarose para a seleção dos clones contendo as mutações desejadas. Os clones apresentando os fragmentos de DNA com massas moleculares levemente superiores (63 pb) ao do pET28-ES foram selecionados. Os plasmídeos selecionados foram submetidos à sequenciamento de DNA, utilizando como iniciador tanto a sequência de DNA do promotor T7 como também o primer “T7 terminator”. Os sequenciamentos foram realizados no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

3.2.4. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS E ISOLAMENTO DE CORPOS DE INCLUSÃO

Bactérias *E. coli* BL-21 (DE3) competentes foram transformadas por eletroporação com os vetores pET28-ES, pET28-ES-PUMA e ES28-ES-BIM e plaqueadas em ágar LB contendo 30µg/mL de canamicina. Colônias recém transformadas foram semeadas em 250mL de meio rico 2HKS II (Jensen e Carlsen, 1990) contendo 30µg/mL de canamicina e cultivadas em agitação a 37°C até a densidade óptica 3,0 a 600nm. Adicionou-se então, IPTG a uma concentração final de 0,5mM. O cultivo foi mantido por mais 16 horas medindo novamente a densidade óptica a 600nm no final deste período. Os meios de cultura foram centrifugados a 2500x g por 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados contendo as proteínas de interesse foram ressuspensos em 50mL de tampão contendo 100mM Tris-HCl pH7,5 e 5mM EDTA, seguida pela adição de lisozima em concentração final de 50µg/mL e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. A suspensão obtida foi sonicada na presença de 0,1% de deoxicolato de sódio e centrifugada a 8000x g por 15 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e a fração insolúvel foi

ressuspensa em uma solução de 0,05M de Tris-HCl pH7,5, contendo 5mM de EDTA e 0,1% de deoxicolato de sódio. Este processo de lavagem foi repetido por mais duas vezes e o precipitado final foi solubilizado em tampão Tris 50mM pH 7,5 e 1mM de EDTA. A densidade óptica da suspensão de corpos de inclusão foi lida, ao final do processo em espectrofotômetro em comprimento de onda de 350nm.

3.2.5. RENATURAÇÃO UTILIZANDO ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (APH)

Para a renaturação da ES e das proteínas de fusão, seguimos o protocolo descrito que utiliza a APH (Chura-Chambi, Cordeiro *et al.*, 2013). Foi realizada uma diluição adequada a se obter uma densidade óptica final de 1,0 em tampão Tris 50mM pH 7,5 contendo 1mM de EDTA , 1,5M de hidrocloreto de guanidina (GdnHCl) e Glutathione oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) a uma concentração final de 0,5mM cada uma. As suspensões resultantes foram transferidas para sacos plásticos, que foram selados e introduzidos em sacos plásticos maiores que foram selados a vácuo. Os sacos plásticos foram colocados em vaso de pressão contendo óleo como fluido de transmissão e aplicou-se primeiramente, uma pressão de 2,4 kbar por 90 minutos e em seguida, reduzida para 5 kbar por aproximadamente 16 horas. Após a completa despressurização as amostras foram centrifugadas a 12000x g por 15 minutos para separar os agregados insolúveis da fração solúvel. A fração solúvel prosseguiu para diálise em tampão Tris 50mM pH 7,5 para se retirar a GdnHCl, glutathionas oxidada e reduzida e EDTA, novamente centrifugada a 12000x g por 15 minutos e estocada a -20°C.

3.2.6. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Após diálise, as proteínas renaturadas foram aplicadas em coluna HiTrap Heparin de 1mL pré tratadas com 5 volumes da coluna em tampão Tris HCl 50mM pH 7,5. As proteínas foram então eluídas usando um gradiente de

NaCl de 0 a 1M. As purificações foram realizadas com fluxo de 0,8mL/minuto e frações foram coletadas a cada 1mL de eluição em coletor automático do sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), com medição contínua de absorvância a 280nm. Com base no cromatograma obtido, as frações que continham o correspondente à absorvância máxima foram coletadas e testadas para a presença de proteínas utilizando solução de Bradford (1976), sendo que as positivas passaram por nova diálise em tampão Tris HCl 50mM pH 7,5 para retirada do NaCl das amostras purificadas.

3.2.7. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RENATURADAS

3.2.7.1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A análise da expressão, purificação e renaturação das proteínas de se deu em eletroforese em gel de acrilamida a 15% seguindo protocolo descrito por Laemli (1970). As amostras foram diluídas para uma concentração conhecida e tratadas ou não com agente redutor (DTT) a uma concentração final de 0,2M e um tampão de amostras contendo corante e glicerol 5x concentrado, aquecidas por 5 minutos a 95°C e aplicadas no gel. A corrida se deu a 110 volts até o corante azul de bromofenol, utilizado como marcador, chegar ao final do gel. No mesmo gel, foi aplicado um marcador de peso molecular para futura comparação das massas das proteínas analisadas. Após a corrida, o gel foi submerso em solução corante contendo 0,25% de Comassie blue G e 10% de ácido acético e mantido em agitação por 1 hora e em seguida descorado em uma solução de ácido acético 10%, sendo assim, realizada trocas sucessivas desta solução até o descoramento do gel com visualização das bandas proteicas.

3.2.7.2. DOSAGEM DAS PROTEÍNAS

As proteínas purificadas e dialisadas para retirada do NaCl foram dosadas com base em sua absorção a 280nm. As leituras obtidas foram relacionadas com seu coeficiente de extinção molar (ϵ) obtendo-se assim, sua

concentração em mg/mL. ϵ 6H-ES = 26840 ; ϵ 6H-ES-PUMA= 27960; ϵ 6H-ES-BIM= 27960.

Os valores de coeficiente de extinção molar (ϵ) foram obtidos através da ferramenta online *ExpASy ProtParam Tool* que usa algoritmos específicos levando em conta a sequência de aminoácidos fornecida. Ainda utilizando essa ferramenta, outros dados teóricos foram obtidos, como o pI teórico (9,07 para ES-PUMA e 8,47 para ES-BIM), peso molecular (23617,5 para ES-PUMA e 23778,6 para ES-BIM) e sua meia vida teórica estimada (meia vida ES-PUMA e ES-BIM aproximado de 3,5 horas *in vitro* em reticulócitos).

3.2.8. ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO

3.2.8.1. VIABILIDADE CELULAR

O teste de viabilidade celular foi baseado na técnica colorimétrica utilizando MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]] com auxílio do reagente acoplador de elétrons PMS (phenazine methosulfate). A linhagem celular utilizada para analisar a ação das proteínas em estudo foi a C-PAE, célula endotelial de artéria de pulmão de bezerro, adquirida da ATCC (CCL-209, Manassas, VA). As células foram mantidas em meio mínimo essencial EMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, 50U/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina, em estufa incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Concentrações iniciais de 5000 células por poço em 100 μ L de meio EMEM 2% soro fetal bovino foram incubadas em placas de 96 poços nas mesmas condições citadas acima. Após 24 horas de incubação, o meio foi trocado por 100 μ L de meio EMEM contendo 2% soro fetal bovino, porém desta vez, com presença de 5ng/mL de bFGF (fator básico de crescimento) e das proteínas testes em diferentes diluições. Como branco das proteínas teste, foi utilizado os mesmos volumes de tampão

TrisHCl 50mM pH 7,5. Todas as proteínas, assim como o branco, foram aplicados em triplicata. As células foram incubadas por mais 24 horas.

A viabilidade foi determinada pela adição de 20 μ L da solução de MTS:PMS (20:1) à cada um dos poços contendo células e foi novamente incubada por 2 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de leitura de placa com filtro de 495nm.

3.2.8.2. CITOMETRIA DE FLUXO

A análise por citometria de fluxo foi realizada com a utilização do kit específico para detecção de apoptose da BD: FITC APOPTOSIS DETECTION KIT I. Culturas de células C-PAE foram mantidas em meio EMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, 50U/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina, em estufa incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Concentrações iniciais de aproximadamente 250000 células por poço em 1000 μ L de meio EMEM 2% soro fetal bovino foram incubadas em placas de 6 poços nas mesmas condições citadas acima. Após 24 horas de incubação, o meio foi trocado por 1000 μ L de meio EMEM contendo 2% soro fetal bovino, porém desta vez, incrementado com presença de 5ng/mL de bFGF (fator básico de crescimento) e das proteínas testes na diluição de 25 μ g/mL. Como branco das proteínas teste, foi utilizado o mesmo volume de tampão TrisHCl 50mM pH 7,5.

Após aproximadamente 24 horas de exposição às proteínas teste, seguindo o protocolo específico do kit, as células foram tripsinizadas, ressuspensas, centrifugadas e lavadas com PBS. Após lavagem, as células foram ressuspensas em 100 μ L tampão de ligação 1x e então tratadas com 5 μ L de anexina V e 5 μ L de PI (iodeto de propídeo). As suspensões de células foram gentilmente vortexadas e incubadas em ambiente escuro por 15 minutos. Após 15 minutos de incubação, foi adicionado 100 μ L de tampão de ligação 1x

em cada uma das suspensões de células, que foram por fim, submetidas a análise instrumental em citometro de fluxo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO

As sequências de DNA referentes a BIM e PUMA foram inseridas no vetor pET28-ES por mutagênese sítio-dirigida, obtendo-se assim os vetores de expressão pET28-ES-BIM e pET28-ES-PUMA. A introdução das sequências foi confirmada primeiramente por digestão enzimática dos plasmídeos presentes nos clones resistentes à canamicina, utilizando as enzimas BglII e XhoI seguidas de eletroforese em gel de agarose a 0,6%. Foram utilizados, além do marcador de número de pares de bases, o próprio vetor pET28-ES como referência do número de pares de bases do fragmento de DNA referente ao gene da ES digerido com BglII e XhoI (728 pares de bases). As mutagêneses com resultado aparentemente positivo para uma clonagem bem sucedida: obtenção de fragmentos de 791 pb para ES-PUMA assim como 791 pb para ES-BIM (Figura 9 A, coluna 3 e Figura 9 B, coluna 4) foram posteriormente confirmadas por sequenciamento.

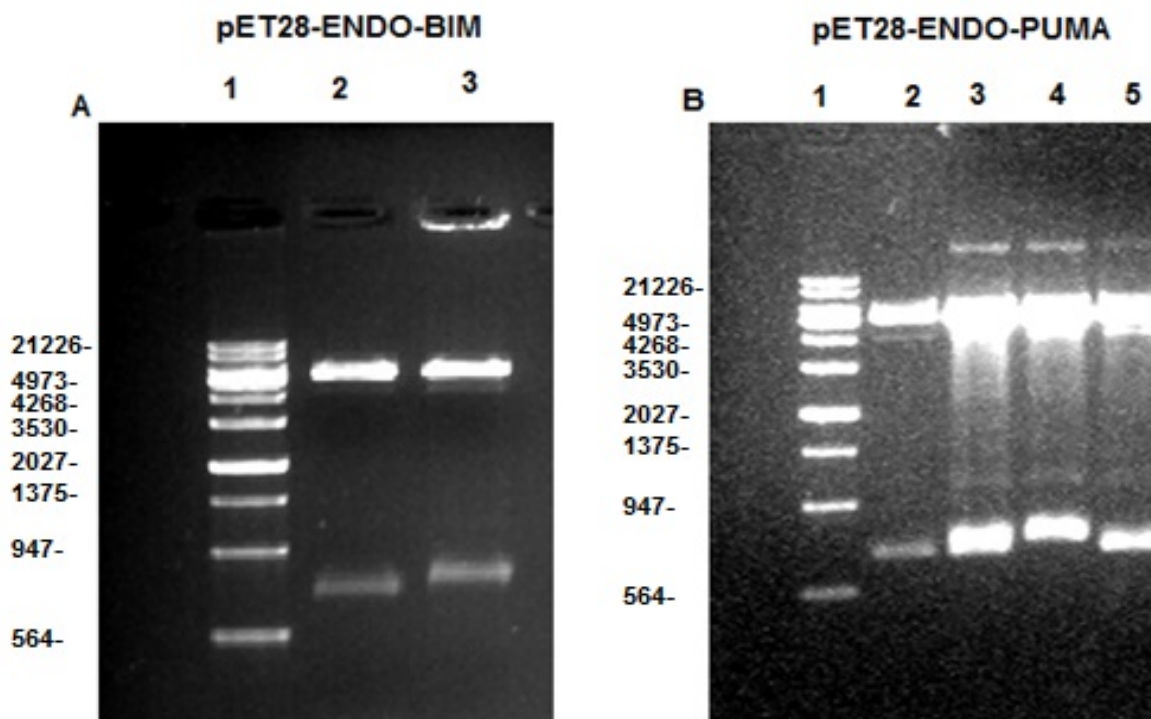


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 0,6% dos plasmídeos purificados dos clones positivos para mutagênese sítio-dirigida digeridos com enzimas BglII e XhoI. **A:** coluna 1: marcador de número de pares de base; coluna 2: pET28-ES; coluna 3: pET28-ES-BIM. **B:** coluna 1: marcador de número de pares de base; coluna 2: pET28-ES; coluna 3: clone possivelmente negativo para mutagênese; coluna 4: pET28-ES-PUMA; coluna 5: clone possivelmente negativo para mutagênese.

4.2. EXPRESSÃO DA ES E DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Houve expressão de ES e também das proteínas de fusão quando as bactérias *E. coli* transformadas com os vetores de expressão foram cultivadas em meio rico 2HKII e induzidas pela presença de isopropyl- β -D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) como agente indutor de expressão (Figura 10).

As bactérias transformadas com os vetores pET28-ES-PUMA e pET28ES-BIM já começam a produzir as proteínas recombinantes partir de 1 hora após a ativação, conforme observado pelas bandas de peso molecular esperado no gel de eletroforese, denotando presença de ambas as proteínas de fusão nas bactérias induzidas. Por questão de praticidade, foi escolhida

como padrão a ativação por 16 horas de incubação para a produção das proteínas de fusão (Figura 10).

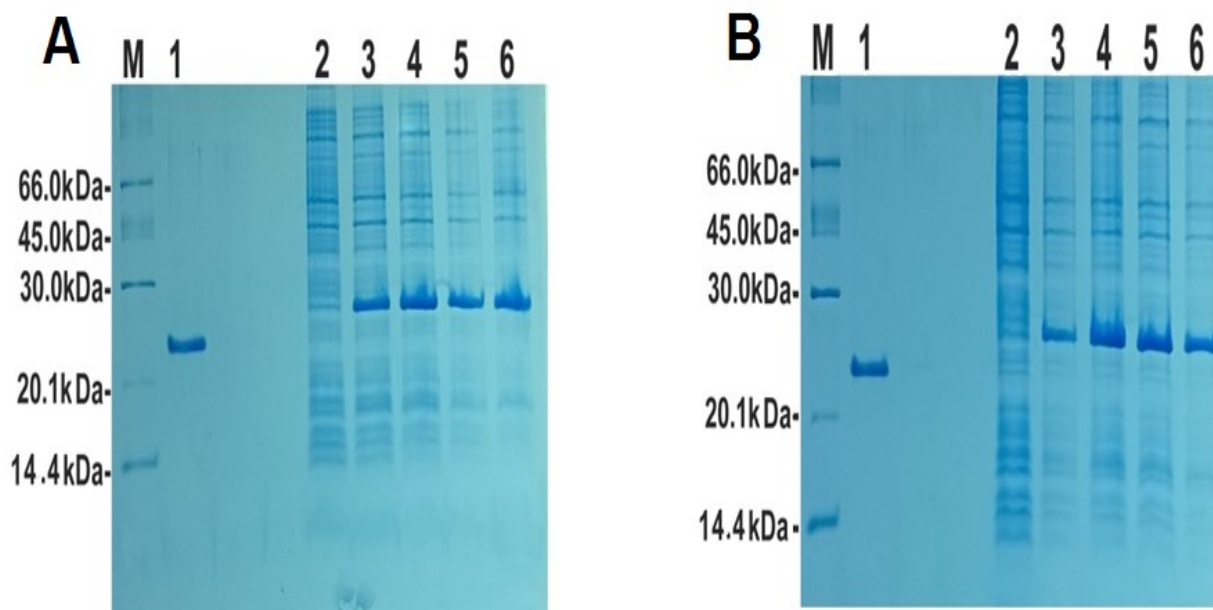


Figura 10: Lisado bacteriano reduzido com DTT, obtido da expressão das proteínas de fusão em *E. coli* cultivadas em meio rico e sob agitação a 37°C e ativadas com IPTG. **A:** Coluna M: Marcador de peso molecular; coluna 1: ES; coluna 2: *E. coli* não ativadas; colunas 3 a 6: *E. coli* transformadas com pET28-ES-BIM induzidas por 1, 2, 3 e 16 horas. **B:** Coluna M: Marcador de peso molecular; coluna 1: ES; coluna 2: *E. coli* não ativadas; colunas 3 a 6, *E. coli* transformadas com pET28-ES-PUMA induzidas por 1, 2, 3 e 16 horas.

4.3. RENATURAÇÃO UTILIZANDO APH

A utilização de alta pressão é uma técnica muito eficiente para a solubilização de agregados proteicos em condições não desnaturantes, muito útil para a renaturação de proteínas produzidas como corpos de inclusão em *E. coli*. A renaturação de ES utilizando APH já havia sido descrita (Chura-Chambi, Genova *et al.*, 2008; Chura-Chambi, Cordeiro *et al.*, 2013) e foi utilizada no presente estudo para a renaturação desta proteína e também das proteínas de fusão. As proteínas ES-BIM e ES-PUMA foram renaturadas com bons rendimentos (86,9 % e 23,3%, respectivamente) (Figura 11). Podemos também observar que as proteínas renaturadas se apresentam praticamente

puras, pois não se pode observar a presença de bandas em outras posições que não a de aproximadamente 23 kDa correspondente às bandas das proteínas de interesse.

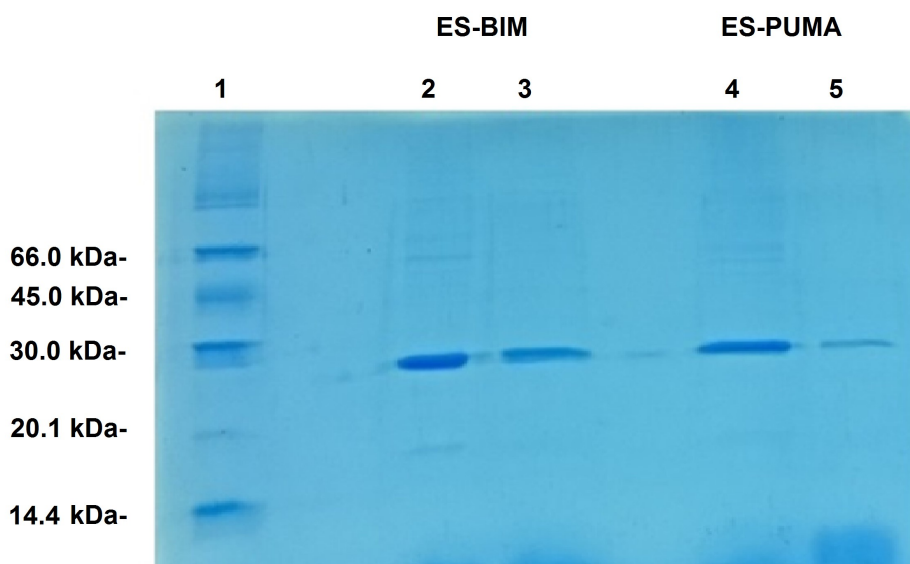


Figura 11: Eletroforese em gel de acrilamida a 15% comparando os corpos de inclusão obtidos na expressão com as proteínas renaturadas por alta pressão. Coluna 1: Marcador de peso molecular; Coluna 2: Corpos de inclusão da proteína ES-BIM; Coluna 3: ES-BIM após renaturação; Coluna 4: Corpos de inclusão da proteína ES-PUMA; Coluna 5: ES-PUMA após renaturação.

4.4. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As proteínas ES-PUMA e ES-BIM foram purificadas por afinidade à heparina e eluídas em gradiente de NaCl. As proteínas foram eluídas em aproximadamente 55% de NaCl (figuras 12 e 13).

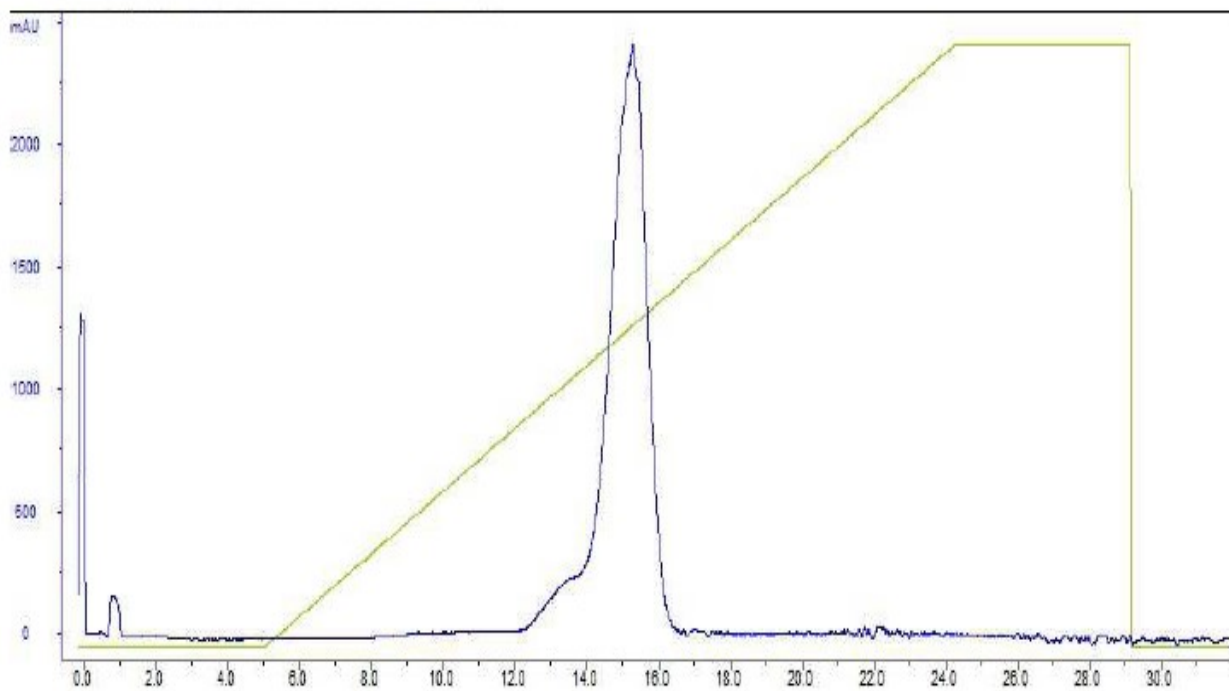


Figura 12: Cromatograma referente à eluição de ES-BIM da coluna de heparina. Em azul é mostrada a absorvância em 280nm e em verde, o gradiente de NaCl de 0 a 1M utilizado na eluição.

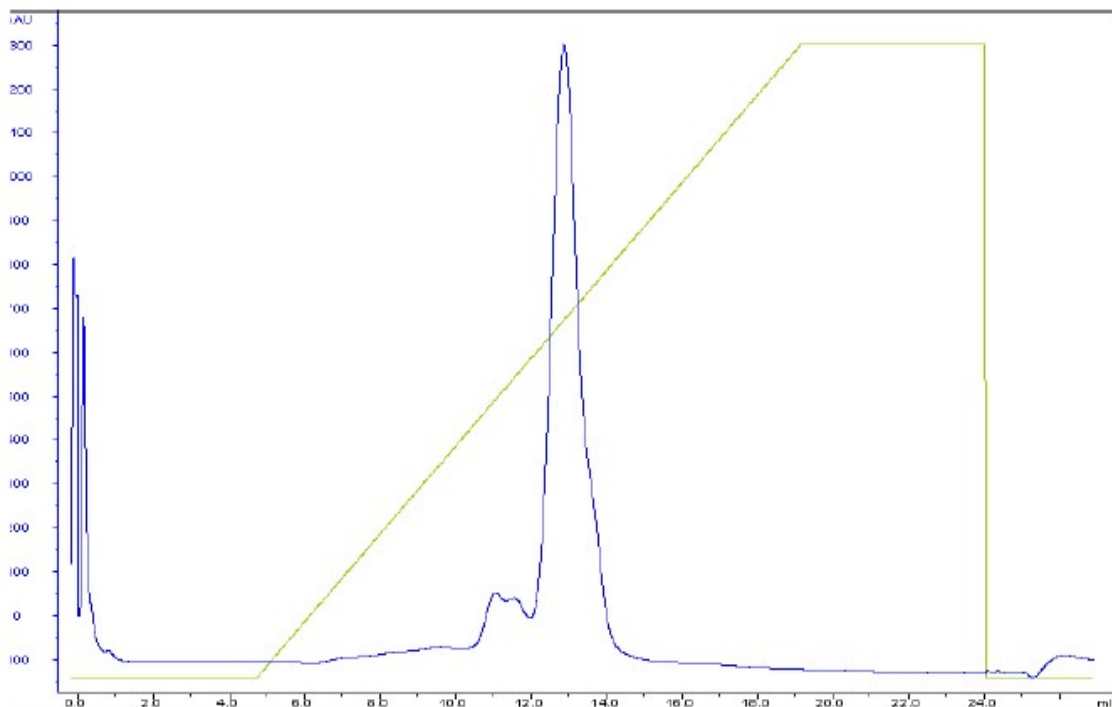


Figura 13: Cromatograma referente à eluição de ES-PUMA da coluna de heparina. Em azul é mostrada a absorvância em 280nm e em verde, o gradiente de NaCl de 0 a 1M utilizado na eluição.

As proteínas ES-PUMA e ES-BIM se apresentaram com padrão de bandas compatível com proteínas de aproximadamente 23 kDa (Figura 13). As proteínas ES-PUMA e ES-BIM se apresentam puras no gel de eletroforese. A ES-BIM, no entanto, apresentou um padrão de banda dupla (figura 14) que indica que a proteína sofreu uma degradação. Em todas as fases do processo de renaturação e de purificação a proteína ES-PUMA se mostrou mais instável do que a proteína selvagem e do que a ES-BIM.

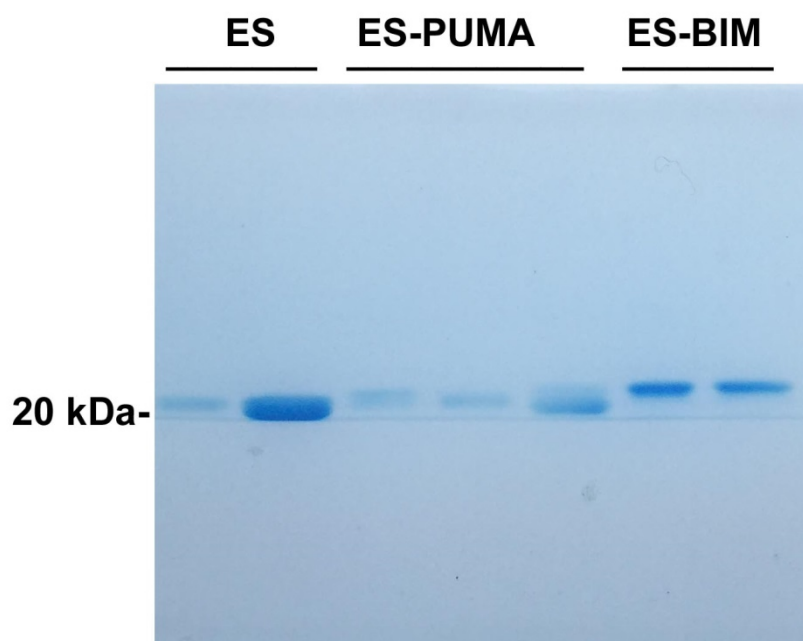


Figura 14: Eletroforese em gel de acrilamida a 15% de dois diferentes lotes de ES, três diferentes lotes de ES-PUMA e dois diferentes lotes de ES-BIM.

4.5. VIABILIDADE CELULAR

As proteínas recombinantes em estudo, ES-BIM e ES-PUMA foram comparadas com a ES quanto à sua habilidade de diminuir a viabilidade celular de células endoteliais, C-PAE (Figura 15).

As concentrações de 25 µg/ml de ES e das proteínas de fusão, assim como o tempo de ensaio, foram escolhidos com base em estudos prévios do grupo, uma vez que na concentração de 25µg/mL, a ES havia apresentado capacidade de diminuição de viabilidade celular, entretanto, sem induzir 100% de morte celular, o que dificultaria a comparação com a proteína em estudo (ES-BAX) (Chura-Chambi, Bellini *et al.*, 2014).

Os resultados do ensaio de MTS demonstram que os domínios BH3 de PUMA e de BIM não foram capazes de melhorar o efeito da ES sobre a viabilidade de células endoteliais: 75% das células tratadas com ES se apresentaram viáveis, enquanto 73% das células tratadas com ES-PUMA e 82% das células tratadas com ES-BIM se apresentaram viáveis. Neste ensaio em particular, além da ES selvagem, também foi analisada a capacidade da proteína ES-BAX desenvolvida por Chura-Chambi, (2014) (Chura-Chambi, Bellini *et al.*, 2014). Somente a proteína ES-BAX apresentou queda significativa na porcentagem de células viáveis na comparação com a ES, de 63%, reproduzindo os resultados já obtidos para esta proteína (Figura 15). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi analisada pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni ($P < 0,05$) e não foi obtida diferença significativa entre a perda de viabilidade das células tratadas com ES e ES-PUMA, mas foi observada diferença significativa entre os tratamentos com ES e ES-BAX. Foi também estatisticamente significativa a diferença entre a viabilidade das células tratadas com a proteína ES-BIM e a proteína selvagem, sendo que a ES-BIM foi menos efetiva na perda de viabilidade.

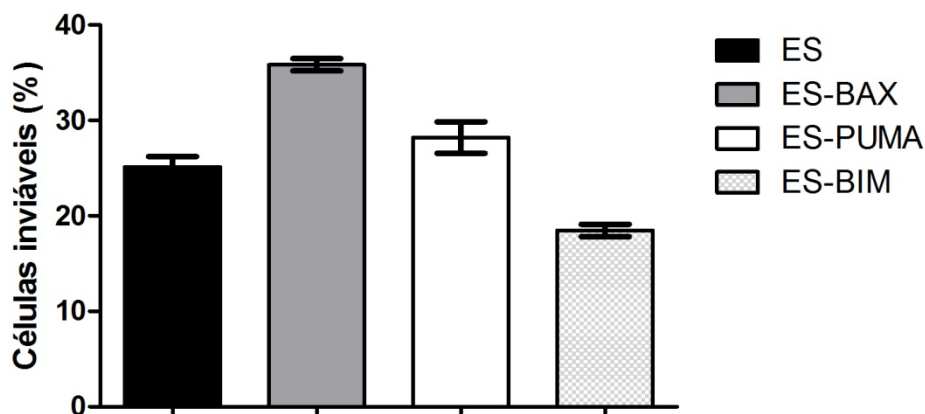


Figura 15: Efeito obtido em ensaio de viabilidade celular (MTS) em uma população de aproximadamente 8000 células C-PAE após 24 horas de exposição a 25 $\mu\text{g/ml}$ das proteínas em estudo. Os dados foram obtidos em triplicata.

4.6. CITOMETRIA DE FLUXO

Os resultados do ensaio de citometria de fluxo evidenciaram a capacidade de indução de morte celular por apoptose das proteínas em análise. O híbrido ES-PUMA apresentou resultados semelhantes à proteína selvagem de morte celular e de apoptose. A proteína ES-BIM mostrou capacidade inferior de indução de morte celular do que a da ES (Tabela 1 e Figura 16). Esses resultados corroboram os dados obtidos com o ensaio de MTS, no qual também foi obtida maior % de células viáveis tratadas com ES-BIM (51,6%) do que as células tratadas com ES (23,6%) ou ES-PUMA (36,1%).

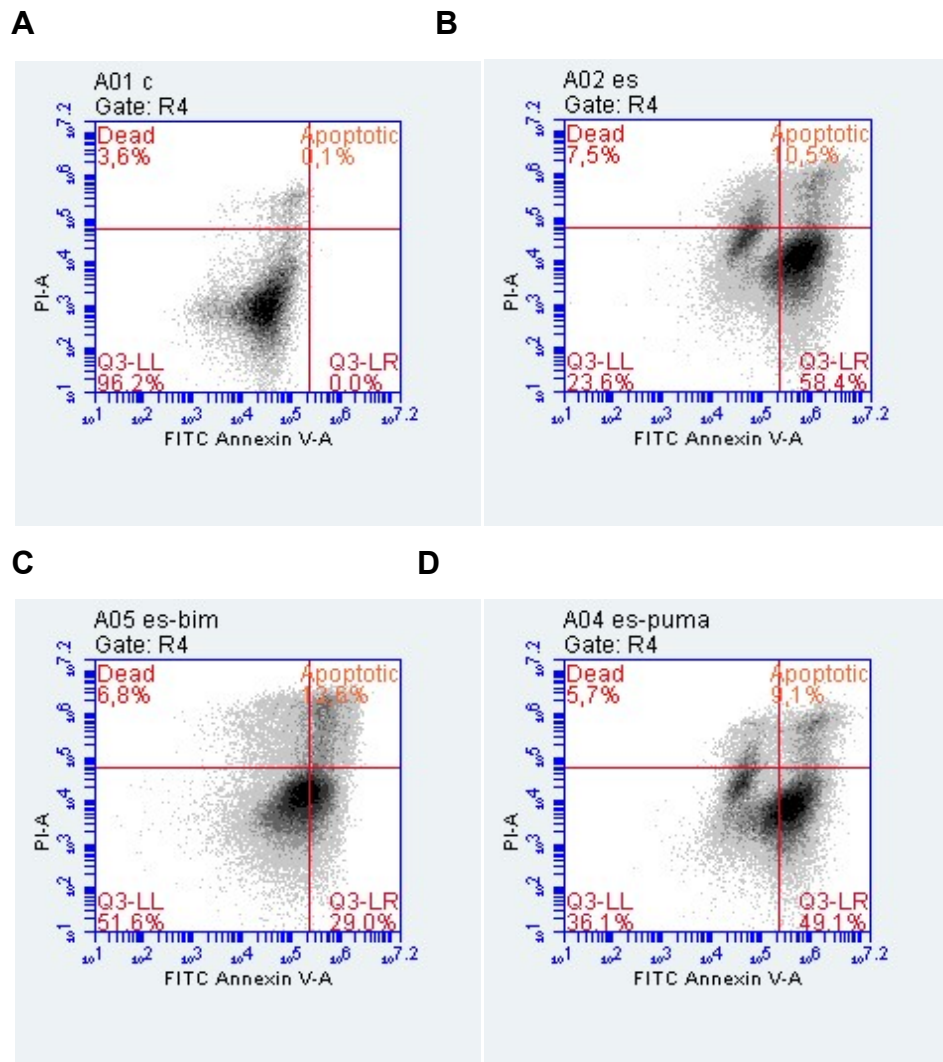


Figura 16: Gráficos de distribuição dos eventos em citometria de fluxo de células C-PAE tratadas com 25 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas. **(A):** Controle (células não tratadas); **(B):** ES, **(C):** ES-BIM; **(D)** ES-PUMA. Onde *dead*: corresponde à porcentagem de eventos que são interpretados como morte por via não apoptótica; *apoptotic*: corresponde à porcentagem de eventos considerados apoptóticos; *Q3-LL*: corresponde à porcentagem de eventos considerados viáveis; *Q3-LR*: corresponde à porcentagem de eventos considerados em apoptose tardia.

Tabela 1: Porcentagem de eventos obtidos para cada proteína relacionados à apoptose, células viáveis, células mortas ou células em apoptose tardia.

Proteína	Apoptose (%)	Células viáveis (%)	Células mortas (%)	Células em apoptose tardia (%)
ES	10,5	23,6	7,5	58,4
ES-BIM	12,5	51,6	6,8	29,0
ES-PUMA	9,1	36,1	5,7	49,1

5. CONCLUSÕES

As sequências de DNA referentes a BIM e PUMA foram introduzidas no plasmídeo molde pET28-ES utilizando a técnica de mutagênese descrita em Kunkel (Kunkel, 1985). A mutagênese foi comprovada em eletroforese de gel de agarose a 0,6% e por sequenciamento. Assim, foi possível prosseguir para a expressão das proteínas em estudo. Bactérias competentes *E.coli* BL-21 (DE3) foram transformadas por eletroporação com sucesso, foram então expressas as proteínas em fusão utilizando IPTG como agente indutor de expressão em *E. coli*. As proteínas foram expressas a partir da primeira hora de indução.

O processo de lavagem dos corpos de inclusão foi importante para a obtenção de ES e das proteínas de fusão apresentando baixo teor de contaminação por proteínas e lipoproteínas bacterianas.

Utilizando o processo previamente descrito de renaturação de ES em APH (Chura-Chambi, Genova *et al.*, 2008; Malavasi, Foguel *et al.*, 2011), foi possível obter-se as proteínas de interesse. O resultado indica que as proteínas de fusão tendem a se comportar como a ES selvagem quando submetidas ao processo de renaturação utilizando APH. Os rendimentos de renaturação de ES-BIM foram de 86,9 % e de ES-PUMA foram de 23,3%, a partir da suspensão de corpos de inclusão. Na figura 4 é possível visualizar as proteínas ES-BIM e ES-PUMA, presentes na fração solúvel após o processo de renaturação. A purificação da ES e das proteínas de fusão, realizada em coluna de heparina foi eficiente. As proteínas híbridas se comportaram de forma semelhante à da proteína selvagem, demonstrando que não houve interferência dos domínios BH3 do BIM e PUMA na ligação a este mucopolisacarídeo. O gradiente de NaCl promoveu a eluição das proteínas da resina, que foram separadas em alíquotas. A quantificação das proteínas foi realizada por absorvância em comprimento de onda de 280nm, com base nos coeficientes de extinção molar. As proteínas se apresentaram com alto grau de pureza e em altas concentrações (de até 2,1 mg/ml), concentração satisfatória para análises posteriores. Contudo, a proteína ES-BIM se mostrou mais instável do que as outras proteínas (ES, ES-PUMA ou ES-BAX),

frequentemente apresentando padrão de banda dupla em gel de eletroforese, o que indica degradação parcial, possivelmente em duas frações.

A proteína ES é internalizada pelas células endoteliais em proliferação (Dixelius, Larsson *et al.*, 2000). Além disso, já demonstramos em estudo realizado pelo nosso grupo que proteínas híbridas constituídas da ES e dos domínios BH3 das proteínas efetoras da apoptose BAX e BAK também são eficientemente internalizadas por células endoteliais em proliferação (Chura-Chambi, Bellini *et al.*, 2014). Apesar de não termos feito testes para avaliar se as proteínas ES-PUMA e ES-BIM são internalizadas por células endoteliais, acreditamos que o sejam pelo fato de estas proteínas apresentarem atividade semelhante à da ES em ensaio de viabilidade celular e de apoptose por citometria de fluxo.

Ficou evidenciado nos ensaios de determinação de morte celular e apoptose, por citometria de fluxo, que as proteínas em estudo, ES-PUMA e ES-BIM, não possuem capacidade maior de induzir a morte celular do que a ES.

Contudo, a proteína ES-BIM se mostrou mais instável do que as outras proteínas (ES, ES-PUMA ou ES-BAX), frequentemente apresentando padrão de banda dupla em gel de eletroforese, o que indica degradação parcial, possivelmente em duas frações.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, J.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, p. 1324-1337, 2007.

AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, p. 1053-61, 1999.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**, v. 1, p. 37-58, 2007.

AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 8, p. 604-17, 2008.

AZAR, Y.; LORBERBOUM-GALSKI, H. GnRH-Bik/Bax/Bak chimeric proteins target and kill adenocarcinoma cells; the general use of pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family as novel killing components of targeting chimeric proteins. **Apoptosis**, v. 5, p. 531-42, 2000.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat rev cancer**, v. 3, p. 401-410, 2003.

BISACCHI, D. et al. Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. **Cancer detect prev**, v. 27, p. 229-238, 2003.

BOEHM, T. et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. **Nature**, v. 390, p. 404-407, 1997.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, p. 298-307, 2011.

CELIK, I. et al. Therapeutic efficacy of endostatin exhibits a biphasic dose-response curve. **Cancer Res**, v. 65, p. 11044-50, Dec 1 2005.

CHEN, L. et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. **Mol Cell**, v. 17, p. 393-403, 2005.

CHUNG, A. S.; LEE, J.; FERRARA, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 10, p. 505-514, 2010.

CHURA-CHAMBI, R. et al. Improving the therapeutic potential of endostatin by fusing it with the BAX BH3 death domain. **Cell death dis**, v. 5, e1371, 2014.

CHURA-CHAMBI, R. M. et al. An analysis of the factors that affect the dissociation of inclusion bodies and the refolding of endostatin under high pressure. **Proc Biochem**, v. 48, p. 250-259, 2013.

CHURA-CHAMBI, R. M. et al. Refolding of endostatin from inclusion bodies using high hydrostatic pressure. **Anal biochem**, v. 379, p. 32-39, 2008.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, v. 2, p. 647-56, 2002.

DA SILVA, T. H. Á. et al. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese- Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha v\beta 3$. **Braz J Pharmac Sci**, v. 43, 2007.

DAI, H. et al. Evaluation of the BH3-only protein Puma as a direct Bak activator. **J Biol Chem**, v. 289, p. 89-99, 2014.

DENG, J. et al. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. **Cancer Cell**, v. 12, p. 171-85, 2007.

DIXELIUS, J. et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. **Blood**, v. 95, p. 3403-3411, 2000.

FLETCHER, J. I. et al. Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax. **P Natl Acad Sci USA**, v. 105, p. 18081-18087, 2008.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J Natl Cancer Inst**, v. 82, p. 4-6, 1990.

FOLKMAN, J. Antiangiogenesis in cancer therapy—endostatin and its mechanisms of action. **Exp Cell Res**, v. 312, p. 594-607, 2006.

FOLKMAN, J. Endostatin finds a new partner: nucleolin. **Blood**, v. 110, p. 2786-2787, 2007.

FOLLIS, A. V. et al. PUMA binding induces partial unfolding within BCL-xL to disrupt p53 binding and promote apoptosis. **Nat chem biol**, v. 9, p. 163-168, 2013.

FU, Y. et al. Unraveling the mysteries of endostatin. **IUBMB Life**, v. 61, p. 613-26, 2009.

FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. **Microvasc Res**, v. 74, p. 72-84, 2007.

GAVATHIOTIS, E. et al. BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. **Mol Cell**, v. 40, p. 481-92, 2010.

GINISTY, H. et al. Structure and functions of nucleolin. **J Cell Sci**, v. 112, p. 761-772, 1999.

GONZÁLEZ, R. P. et al. Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. **Acta Cir Bras**, v. 15, n. 3, p. 168-173, 2000.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626-9, 2004.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Rev Bras Cancerol**, v. 53, 2007.

GUO, Z. et al. Effect of recombinant human endostatin on the expression of c-Myc and bFGF in mouse gastric cancer cells. **Genet Mol Res**, v. 14, p. 5258, 2015.

GUPTA, S. Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging. **Immunol Rev**, v. 205, p. 114-129, 2005.

HAPPO, L.; STRASSER, A.; CORY, S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. **J Cell Sci**, v. 125, p. 1081-7, 2012.

HOHENESTER, E. et al. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 angstrom resolution. **Embo J**, v. 17, p. 1656-1664, 1998.

HOLSTEIN, J. H. et al. Endostatin inhibits callus remodeling during fracture healing in mice. **J Orthop Res**, v. 31, p. 1579-1584, 2013.

HORI, A. et al. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. **Cancer Res**, v. 51, p. 6180-4, 1991.

HUANG, D. C.; STRASSER, A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. **Cell**, v. 103, p. 839-42, 2000.

JAIN, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. **Science**, v. 307, p. 58-62, 2005.

JAVAHERIAN, K. et al. Laminin modulates morphogenic properties of the collagen XVIII endostatin domain. **J Biol Chem**, v. 277, p. 45211-45218, 2002.

JENSEN, E. B.; CARLSEN, S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. **Biotechnol Bioeng**, v. 36, p. 1-11, 1990.

JUIN, P. et al. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. **Nat Rev Cancer**, v. 13, p. 455-465, 2013.

KARAMOUZIS, M. V.; MOSCHOS, S. J. The use of endostatin in the treatment of solid tumors. **Expert Opin Biol Ther**, v. 9, p. 641-8, 2009.

KELEKAR, A.; THOMPSON, C. B. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. **Trends Cell Biol**, v. 8, p. 324-330, 1998.

KIM, K. J. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. **Nature**, v. 362, p. 841-4, 1993.

KIM, Y.-M. et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Fk-1. **J Biol Chem**, v. 277, p. 27872-27879, 2002.

KLUCK, R. M. et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v. 275, p. 1132-6, 1997.

KULKE, M. H. et al. Phase II study of temozolomide and thalidomide in patients with metastatic neuroendocrine tumors. **J Clin Oncol**, v. 24, p. 401-406, 2006.

KUNKEL, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. **P Natl Acad Sci USA**, v. 82, p. 488-492, 1985.

LEE, S.-H. et al. Extension of the in vivo half-life of endostatin and its improved anti-tumor activities upon fusion to a humanized antibody against tumor-associated glycoprotein 72 in a mouse model of human colorectal carcinoma. **Oncotarget**, v. 6, p. 7182-7194, 2015.

LI, R. et al. Targeting antiapoptotic Bcl-2 family members with cell-permeable BH3 peptides induces apoptosis signaling and death in head and neck squamous cell carcinoma cells. **Neoplasia**, v. 9, p. 801-11, 2007.

LIM, J. et al. The effect of intracellular protein delivery on the anti-tumor activity of recombinant human endostatin. **Biomaterials**, v. 34, p. 6261-6271, 2013.

MALAVASI, N. et al. Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model. **Proc Biochem**, v. 46, p. 512-518, 2011.

MATSUMOTO, G. et al. Control of angiogenesis by VEGF and endostatin-encapsulated protein microcrystals and inhibition of tumor angiogenesis. **Biomaterials**, v. 35, p. 1326-1333, 2014.

MILES, K. Tumour angiogenesis and its relation to contrast enhancement on computed tomography: a review. **Europ J Radiology**, v. 30, p. 198-205, 1999.

MILLAUER, B. et al. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. **Nature**, v. 367, p. 576-9, 1994.

MOLDOVEANU, T. et al. The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. **Mol Cell**, v. 24, p. 677-88, 2006.

O'REILLY, M. S. et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v. 88, p. 277-285, 1997.

OTROCK, Z. K. et al. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. **Blood Cell Mol Dis**, v. 39, p. 212-220, 2007.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, v. 146, p. 873-87, 2011.

- SATTLER, M. et al. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. **Science**, v. 275, p. 983-6, 1997.
- SHAHI, P. K.; PINEDA, I. F. Tumoral angiogenesis: review of the literature. **Cancer Invest**, v. 26, p. 104-108, 2008.
- SHANGARY, S. et al. Sequence and helicity requirements for the proapoptotic activity of Bax BH3 peptides. **Mol Cancer Ther**, v. 3, p. 1343-54, 2004.
- SHI, H. et al. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. **Blood**, v. 110, p. 2899-2906, 2007.
- SHI, H. B. et al. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. **Blood**, v. 110, p. 2899-2906, 2007.
- SHICHIRI, M.; HIRATA, Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. **FASEB J**, v. 15, p. 1044-1053, 2001.
- SHOJAEI, F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives. **Cancer lett**, v. 320, p. 130-137, 2012.
- SHWEIKI, D. et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v. 359, p. 843-845, 1992.
- SONG, N. et al. The nuclear translocation of endostatin is mediated by its receptor nucleolin in endothelial cells. **Angiogenesis**, v. 15, p. 697-711, 2012.

SUDHAKAR, A. et al. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrins. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100,p. 4766-4771, 2003.

SUNSHINE, S. B. et al. Endostatin lowers blood pressure via nitric oxide and prevents hypertension associated with VEGF inhibition. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 109, p. 11306-11311, 2012.

SUZUKI, M.; YOULE, R. J.; TJANDRA, N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. **Cell**, v. 103, p. 645-54, 2000.

THOMAS, J. P. et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. **J Clin Oncol**, v. 21, p. 223-31, 2003.

VAN DELFT, M. F. et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. **Cancer Cell**, v. 10, p. 389-99, 2006.

WANG, S. et al. Endostatin Has ATPase Activity, Which Mediates Its Antiangiogenic and Antitumor Activities. **Mol cancer therap**, v. 14, p. 1192-1201, 2015.

WEI, M. C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v. 292, p. 727-30, 2001.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nat med**, v. 17, n. 11, p. 1359-1370, 2011.

WILLIS, S. N.; ADAMS, J. M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, p. 617-25, 2005.

WILLIS, S. N. et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. **Science**, v. 315, p. 856-859, 2007.

XU, H. L. et al. Research advances of endostatin and its short internal fragments. **Curr Protein Pept Sci**, v. 9, p. 275-83, 2008.

YU, J.; ZHANG, L. PUMA, a potent killer with or without p53. **Oncogene**, v. 27, p. S71-S83, 2008.