



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

MARIA LUCIA VIANA REISS PISTILLI

**IDENTIFICAÇÃO DA ENZIMA GERADORA
DA ENDOSTATINA HUMANA: UM PROTEASSOMA
EXTRACELULAR**

**Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal do
Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Doutor em
Ciências Morfológicas**

Rio de Janeiro
Fevereiro/2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**IDENTIFICAÇÃO DA ENZIMA GERADORA
DA ENDOSTATINA HUMANA: UM PROTEASSOMA
EXTRACELULAR**

MARIA LUCIA VIANA REISS PISTILLI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Morfológicas como pré-requisito à obtenção do grau de Doutor em
Ciências Morfológicas**

Orientadora: Prof^a Tatiana Lobo Coelho de Sampaio (UFRJ)

Rio de Janeiro

Fevereiro/2009

FICHA CATALOGRÁFICA

REISS- PISTILLI, Maria Lucia Viana

IDENTIFICAÇÃO DA ENZIMA GERADORA DA ENDOSTATINA HUMANA. Rio de Janeiro, UFRJ, 2009.

Tese de Doutorado

xvii, 155 pp.

1. Câncer 2. Endostatina 3. Protease 4. Proteassoma 5. Inibidores de proteases

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Ciências Biomédicas – ICB

II. Dissertação

**Título: IDENTIFICAÇÃO DA ENZIMA GERADORA DA
ENDOSTATINA HUMANA: UM PROTEASSOMA EXTRACELULAR**

Autora: Maria Lucia Viana Reiss Pistilli

Tese de Doutorado submetida à avaliação pelo Programa de Pós-Gaduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovada por:

Prof^a. _____
Tatiana Lobo Coelho de Sampaio (ICB/UFRJ)
Orientadora

Prof. _____
Luiz Juliano (EPM)

Prof^a. _____
Cláudia dos Santos Mermelstein (ICB/UFRJ)

Prof. _____
Robson Monteiro (IBqM/ UFRJ)

Prof. _____
Luiz Eurico Nasciutti (ICB/UFRJ)
Suplente

Prof. _____
Marcelo Einicker Lamas (IBCCF/UFRJ)
Revisor

Rio de Janeiro

Fevereiro/2009

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Matriz Extracelular do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas na Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Tatiana Lobo Coelho de Sampaio, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

**DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO AO DEUS FIEL
E MARAVILHOSO QUE SEMPRE ME
FORTALECEU, NOS MOMENTOS DE
DIFICULDADES, COM SEU INFINITO AMOR.**

&

**AGRADEÇO A TODOS OS
PROFESSORES E AMIGOS QUE
TORCERAM E CONTRIBUIRAM PARA O
DESENVOLVIMENTO DESTE
TRABALHO**

“Onde há uma vontade, há um caminho”.

Ditado inglês

RESUMO

Neste trabalho procuramos identificar a enzima geradora da endostatina (ES) humana. A ES é um potente inibidor da angiogênese e do crescimento tumoral em modelos animais, gerada pela clivagem do C-terminal do colágeno XVIII (Col XVIII), um proteoglicano de sulfato de heparana presente em membranas basais. A ES foi isolada, originalmente, do meio condicionado de uma linhagem celular derivada de um hemangioendotelioma murino (EOMA), a partir da idéia de se buscar em tumores não metastáticos, proteínas que inibissem a angiogênese. Em testes experimentais a ES levou à regressão sem recidiva de três tipos tumorais humanos implantados em camundongos, não promovendo resistência à droga e nem toxicidade. Até o presente duas proteases foram identificadas como capazes de gerar a endostatina a partir do colágeno XVIII murino: a elastase e a catepsina L. Contudo tais proteases foram incapazes de gerar a ES humana, fato que motivou nossa pesquisa no sentido de identificar esta protease. Para tanto, um peptídeo fluorogênico mimetizando o sítio de clivagem do Col XVIII na geração da ES foi empregado. A clivagem do peptídeo era detectada quando este era adicionado a um tumor primário (astrocitoma) e a linhagens tumorais (EOMA, Hepa 1-6, HepG2, RD, SK e Lovo). Já as células não transformadas não puderam apresentar o mesmo desempenho. A atividade da protease foi significativamente inibida pelos inibidores gerais de serino-proteases AEBSF e benzamidina, de quimotripsina, quimostatina e TPCK, e por um inibidor de proteassomas, o MG132. A protease está claramente associada à fração celular, não sendo solúvel, mas sendo liberada para o sobrenadante em decorrência do destacamento celular. Tiramos vantagem desta propriedade para obter uma amostra da protease parcialmente purificada com a coleta do sobrenadante. A seguir, com emprego sucessivo de dispositivos de filtração, o centricon, e de uma coluna de gel filtração para FPLC, a Superose 6HR, pudemos avançar em direção à purificação da protease a partir do sobrenadante. A protease corresponde a um complexo multimérico de alto peso molecular, cujas subunidades são reconhecidas por anticorpo anti-subunidades de proteassoma, tendo sido a subunidade $\alpha 2$ de proteassoma seqüenciada em amostra ativa. Além disso, pudemos visualizar por microscopia eletrônica a presença de uma estrutura cilíndrica com seção em anel, bastante semelhante à estrutura de um proteassoma. Desse modo, os resultados apresentados demonstram ser a enzima geradora da endostatina humana um proteassoma ancorado extracelularmente e preferencialmente expresso em células tumorais.

ABSTRACT

The main goal of this work was to identify the protease responsible for generating endostatin from a human substrate. Endostatin, a potent inhibitor of angiogenesis and tumor growth in animal models, is the C-terminal fragment of collagen XVIII, a heparan sulfate proteoglycan present in basement membranes. Endostatin was first isolated from a murine haemangioendothelioma (EOMA), while screening non-metastatic tumors for endogenous production of angiogenesis inhibitors. In experimental tests, endostatin was able to cause regression of three types of human tumors implanted in mice, whereas no drug resistance or toxicity were observed. Up to now, two proteases have been identified as capable of producing endostatin in mice: elastase and cathepsin L. However, these proteases were not able to generate human endostatin, fact that has motivated our work. We used a fluorogenic peptide mimicking the cleavage site for the generation of endostatin in human collagen XVIII. Cleavage of the peptide was detected when it was added to a primary tumor (astrocytome) and tumor lineages (EOMA, Hepa 1-6, HepG2, RD, SK and Lovo). Non-tumor cells did not show the same ability. The protease activity was significantly inhibited by the general inhibitors of serine proteases, AEBSF and benzamidine, by the chymotrypsin inhibitors, TPCK and chymostatin and by a proteasome inhibitor, MG132. The protease is associated to the cellular fraction in a cell culture, it is not constitutively shedded, but released to the supernatant after cellular detachment. We took advantage of the latter property to obtain a partially purified protease sample. We collected the supernatant of EOMA cells and further purified it, using a centricon device and the FPLC gel filtration column, Superose 6HR. The protease corresponds to a high molecular weight multimeric complex, whose subunits were recognized by an anti-proteasome antibody. In addition, the $\alpha 2$ proteasome subunit was sequenced out of the purified material. Analysis of the complex by electron microscopy revealed a cylinder-like structure with a ring-shaped cross section, very similar to the structure of a proteasome. The results presented here demonstrate that the human endostatin-generating enzyme is a membrane-associated proteasome, extracellularly anchored and preferentially expressed in tumor cells.

ABREVIATURAS

Abs	absorbância
Abz	ácido orto-aminobenzóico
acLDL	lipoproteína de baixa densidade acetilada
ACN	acetonitrila
Ad-VEGF A	VEGF A expresso por vetor adenoviral.
AEBSF	[4-(2-aminoethyl)benzenesulfonylfluoride]
AIDS	síndrome da imuno-deficiência adquirida
AKT	família das proteíno-quinases B ou PKB.
Ang-1	angiopoetina 1
Ang-2	angiopoetina 2
ATPase	adenosina trifosfatase
Bax	proteína X associada à Bcl
Bcl2	proteína de linfoma de células B tipo 2
bFGF	fator de crescimento de fibroblasto básico ou tipo 2
BSA	albumina do soro bovino
Ca ²⁺	cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CAM	molécula de adesão celular
CD	complexo de diferenciação celular
CD-31	complexo de diferenciação celular 31 ou PECAM-1
CDK	proteína quinase dependente de ciclina
cDNA	DNA cíclico
CHCA	ácido alfa-ciano 4-hidroxicinâmico
CHO	células epiteliais de ovário de hamster chinês
Col XVIII	colágeno XVIII
COOH-terminal	carboxiterminal ou C-terminal
CPAE	células endoteliais de artéria pulmonar bovina
Da	Dalton

DIG	glicolípídios insolúveis em detergente
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetil sufóxido
DRM	domínios de membrana resistentes à detergente
E64	(2 S, 3 S)-3-(N-((S)-1-[N-(4-guanidinobutil) carbamoil] 3-metilbutil) carbamoíl) oxirano-2-carboxílico
EC	células endoteliais
ECA	enzima conversora de angiotensina
EDDnp	etileno-2,4-dinitrobenzeno
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
EGF	fator de crescimento epidermal
EGFR	receptor do fator de crescimento epidermal
EGM	meio especial para endotélio microvascular
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EOMA	hemangioendotelioma de camundongo
Erk	quinase regulada por sinal extracelular
ES	endostatina
E-selectina	selectina do endotélio
FAK	proteína quinase de adesão focal
FGF	fator de crescimento de fibroblasto
FGFR	receptor do fator de crescimento de fibroblasto
flk-1	proteína quinase do fígado fetal
Fmoc	cloreto de fluorenilmetiloxicarbonil
FPLC	cromatografia líquida rápida para proteínas
FvW	fator de von Willebrand
GM7373	células endoteliais de aorta bovina
GPI	glicosil fosfatidil inositol
Ham's F12	meio para células CHO com mistura nutriente F12
HB-EGF	fator de crescimento do endotélio ligado à heparina
HCl	ácido clorídrico
Hep G2	hepatoblastoma humano
Hepa 1-6	hepatoma de camundongo
HIF-1 α	fator 1 α induzível por hipóxia

HMVEC	célula endotelial de microvaso humano
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
HUVEC	células endoteliais de veia umbilical humana
IC ₅₀	concentração inibitória média
ICDC	captura por domínio catalítico inativado
Ig	imunoglobulina
IκB	inibidor do fator nuclear K beta
IKK	quinase de IκB
IL-6	interleucina 6
kDa	quilodalton
KDR	receptor com domínio para inserção de quinase
Kg	quilograma
K _m	velocidade média
K _{on}	constante de associação do complexo protease-substrato
LDL	lipoproteína de baixa densidade
Lovo	carcinoma de colo humano
M199	meio 199
MA104	células epiteliais de rim de macaco
MALDI-TOF	ionização à laser de matriz
MAPK	proteína-quinase ativada por mitógeno
MDCK	células epiteliais de ducto coletor renal de camundongo
mdr1	gene de resistência multidroga tipo 1
MEK	quinase da MAPK
MEM	meio essencial mínimo
MG	miligrama
MG132	L- leucil-L- leucil-L- leucinal carbobenzoxi
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MHC-1	complexo de histomorfo-diferenciação tipo 1
Min	minuto
mM	milimolar
MMP	metalo-protease de matriz
MT-MMP	MMP de membrana

Multiplexinas	múltiplos domínios tripla hélice separados por interrupções
NaCl	cloreto de sódio
NC1	domínio não colagenoso 1
N-caderina	caderina neural
NFkB	fator nuclear <i>k</i> beta.
NH2-terminal	aminoterminal ou N-terminal
Nm	nanômetro
nM	nanomolar
PA	ativador de plasminogênio
PAEC	células endoteliais de aorta de porco
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAI-1	inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PAR	receptor do ativador de plasminogênio
PBS	tampão fosfato salina
PDGF	fator de crescimento derivado de plaqueta
PECAM-1	molécula de adesão de célula endotelial/plaqueta
pH	potencial hidrogeniônico
pI	potencial isoeletrico
PI3K	fosfatidil inositol 3 quinase
PM	peso molecular
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPM	partes por milhão
RCF	força centrífuga relativa
RD	rabdomiossarcoma de embrião humano
RGD	domínio arginina-glicina-asparagina
rmNC1	NC1 recombinante murino
RNA _m	RNA mensageiro
RPMI	meio desenvolvido em “ <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute”
RT-PCR	reação de polimerização em cadeia por transcriptase reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SK Hep 1	adenocarcinoma de fígado humano
SN	sobrenadante

SRC	vírus de Rous em galinha
Stains-all	3,3'-Diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiacarbocyanine
TEM	microscopia eletrônica de transmissão
TFA	ácido trifluoroacético
TGF- β	fator de crescimento tumoral β
Tie-1	tirosino-quinase com domínios Ig e EGF tipo 1
TIMP	inibidor de MMP tissular
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TNP-470	O-(cloroacetilcarbamoil)fumagilol
TOFSpec	espectrômetro de massa
tPA	ativador de plasminogênio tipo tissular
TPCK	N-tosil-L-fenilalanina-clorometil-cetona
Tris	Tris (hidroximetil) amino-metano
TSP	trombospondina
uPA	ativador de plasminogênio tipo uroquinase
uPAR	receptor de uPA
UV	ultra violeta
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	receptor de VEGF
α -SMA	alfa actina de músculo liso
μ M	micromolar

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da endostatina	19
Figura 2: Diagrama da topologia conformacional da endostatina	20
Figura 3: Representação esquemática da membrana basal	22
Figura 4: Anastomoses artério-venosas	29
Figura 5: Imunofluorescência de vasos tumorais	32
Figura 6: Isoformas de VEGF com os subtipos de receptores de VEGF	34
Figura 7: Seqüência primária do NCI humano	48
Figura 8: Colágeno XVIII murino	63
Figura 9: Proteólise de peptídeo fluorogênico	64
Tabela 1: Culturas celulares	69
Figura 10: Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 12% referente à fração 6	75
Figura 11: Seqüência de aminoácidos do NC-1 humano recombinante ligado a c-myc	79
Tabela 2: Listagem das células testadas e suas atividades proteolíticas sobre os substratos fluorogênicos	85
Figura 12: Gráficos demonstrativos da atividade de hidrólise do peptídeo fluorogênico humano por células tumorais e normais	86
Figura 13: Análise por expectrometria de massa dos produtos do peptídeo fluorogênico incubado por 2 h com a fração 6	87
Figura 14: Análise por expectrometria de massa dos produtos do peptídeo fluorogênico incubado por 12 h com a fração 6	88
Figura 15: Análise por expectrometria de massa dos produtos do peptídeo fluorogênico incubado por 26 h com a fração 6	89
Tabela 3: Possíveis pesos moleculares de peptídeos gerados por proteólises crescentes, aminoácido-a-aminoácido, do peptídeo fluorogênico	90

Figura 16: Microscopia óptica de contraste de fase de cultura de células EOMA	94
Figura 17: Atividade proteolítica de diferentes frações das células EOMA	95
Figura 18: Análise da atividade proteolítica do sobrenadante de células EOMA em diferentes pHs	96
Figura 19: Análise da atividade proteolítica do sobrenadante de células EOMA submetidas a diferentes velocidades de centrifugação	97
Figura 20: Comparação entre as atividades encontradas no sobrenadante de EOMA após filtração no dispositivo YM-100	99
Figura 21: Perfil de eluição do sobrenadante de EOMA em coluna de gel filtração	100
Figura 22: Inibição da atividade proteolítica da fração 6.....	102
Figura 23: Fotomicrografias das partículas presentes na fração 6 de EOMA	103
Figura 24: Geração da endostatina a partir de NC-1 humano	105
Figura 25: A protease da fração 6 de astrocitoma humano pode gerar endostatina a partir do Col XVIII humano	107
Figura 26: Subunidade de proteassoma em gel seqüenciado e pareado com <i>western blot</i>	109
Figura 27: Subunidades de proteassoma em fração 6 de EOMA	110
Figura 28: Géis nativos pareados com <i>western blot</i>	112
Figura 29: Gel de atividade	113
Figura 30: SDS-PAGE 12% corado por <i>Stains-All</i>	114
Figura 31: <i>Dot blot</i> pareado com emprego de toxina colérica e de anticorpo anti-subunidades de proteassoma	115
Figura 32: Representação esquemática da prolina	118

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
ABREVIATURAS	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiv
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Câncer	23
1.2. Angiogênese	27
1.2.1. Angiogênese em ambiente normal e tumoral	28
1.2.2. Inibidores angiogênicos	35
1.2.2.1. Inibidores de proteases.....	36
1.2.2.2. Bloqueadores de moléculas de adesão célula- matriz	38
1.2.2.3. Bloqueadores de ativadores de angiogênese	40
1.2.2.4. A trombospondina	41
1.2.2.5. A angiostatina	42
1.2.2.6. A endostatina	44
1.3. Proteases	50
1.3.1. Proteases em sítios angiogênicos e tumorais	55
1.3.2. Proteassomas em sítios normais e tumorais	59
1.3.3. Proteases implicadas na geração da endostatina	61
2. OBJETIVOS	65
2.1. Objetivo geral	66
2.2. Objetivos específicos	66
3. MATERIAL E MÉTODOS	68
3.1. Culturas celulares	69
3.2. Síntese de peptídeo	71
3.3. Medidas de proteólise	72
3.4. Inibidores de proteases	73

3.5. Purificação da protease	74
3.6. Contrastação negativa	76
3.7. Identificação de proteína com emprego de espectrômetro de massa	76
3.8. Análise do ponto de clivagem do peptídeo	77
3.9. Expressão e purificação de NCI marcado por myc	78
3.10. Processamento de NCI recombinante	79
3.11. Detecção de endostatina em meio condicionado de HUVEC	79
3.12. Detecção das subunidades do <i>core</i> protéico do proteossoma	80
3.13. Caracterização das bandas do sobrenadante de EOMA com emprego de corante <i>Stains-All</i>	80
3.14. Detecção de banda com atividade enzimática em gel nativo de poliacrilamida	80
3.15. Detecção de proteossoma associado à raft lipídica	81
4. RESULTADOS	82
4.1. Degradação do peptídeo fluorogênico por várias células	83
4.2. Inibição da atividade proteolítica	91
4.3. Localização da protease	92
4.4. Purificação da protease	98
4.5. Caracterização da protease purificada	101
4.6. Teste de atividade da protease empregando o NCI humano como substrato	104
4.7. Purificação da protease de astrocitoma humano	106
4.8. Seqüenciamento da subunidade $\alpha 2$ de proteossoma	108
4.9. Gel de atividade pareado com <i>western blot</i> anti-subunidade de proteossoma	111
4.10. Bandas coradas por <i>Stains-All</i>	114
4.11. Proteossoma localizado na fração de <i>raft</i> lipídica.....	115
5. DISCUSSÃO	116
6. CONCLUSÃO	128
7. REFERÊNCIAS	130

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O colágeno XVIII é um proteoglicano de sulfato de heparana presente em diversas membranas basais, principalmente endoteliais (Rehn & Pihlajaniemi, 1995). Os colágenos XVIII e XV formam o subgrupo das multiplexinas que se distinguem dos demais componentes da superfamília dos colágenos por apresentarem múltiplas interrupções de sua estrutura central em tripla hélice e um domínio não helicoidal no COOH-terminal (NC1) (Rehn & Pihlajaniemi, 1994). Ao analisarmos estruturalmente o domínio NC1 de 38 kDa, verificamos que este consiste de três segmentos principais: um domínio de associação N-terminal de 5 kDa que tem sido implicado na auto-polimerização homotrimérica do colágeno XVIII; uma região central em dobradiça sensível à ação de proteases e um domínio globular compacto COOH-terminal de 20 kDa, correspondente à endostatina. A endostatina (ES) é uma proteína globular constituída por 16 folhas- β , duas α -hélices e duas pontes dissulfeto, interligadas por conexões (Figuras 1 e 2).

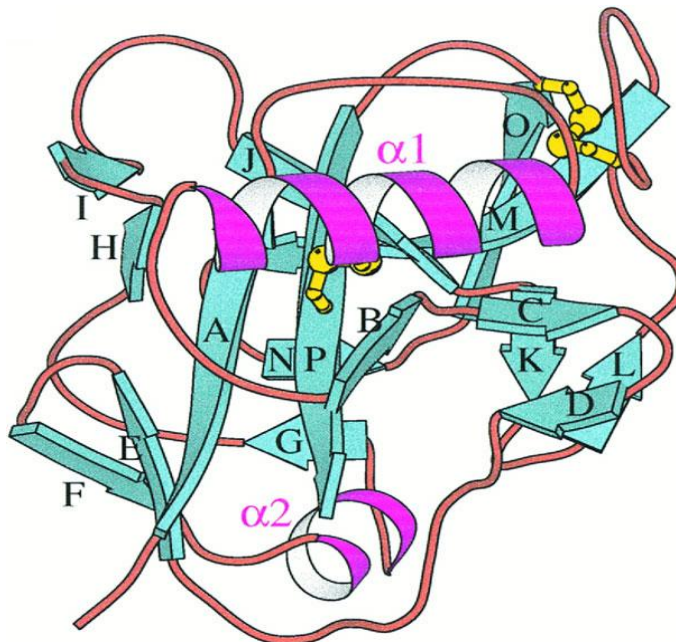


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da endostatina. As folhas- β estão indicadas seqüencialmente pelas letras de A a P. As α -hélices estão em cores rosa e as pontes dissulfeto em amarelo (Kraulis, 1991).

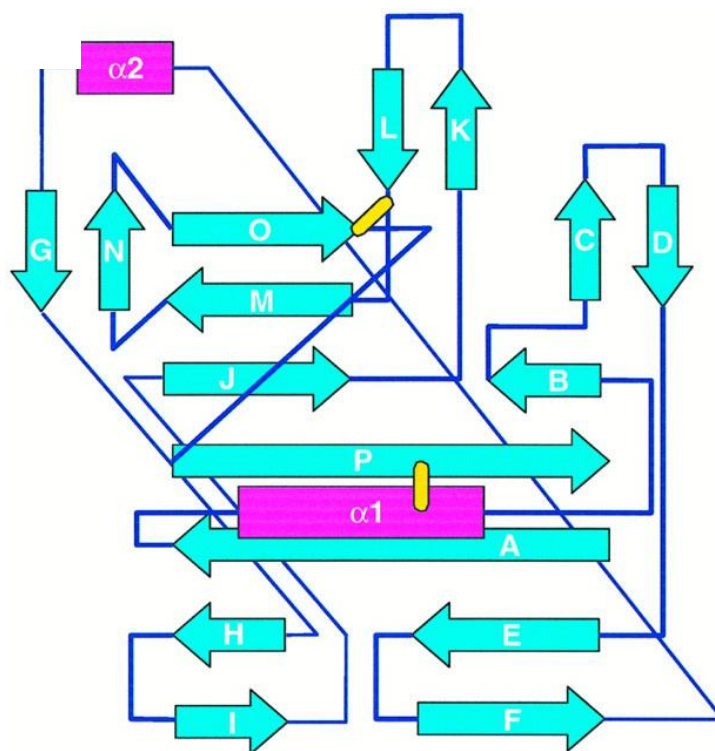


Figura 2: Diagrama da topologia conformacional da endostatina. O esquema de cores é o mesmo para folhas- β , α -hélices e pontes dissulfeto que o da Figura 1. Linhas diagonais largas e estreitas indicam as conexões acima e abaixo das folhas- β , respectivamente (Hohenester *et al.*, 1998).

A endostatina, um potente inibidor de angiogênese, foi inicialmente isolada como um produto de hidrólise do colágeno XVIII presente no sobrenadante de uma cultura de células EOMA, um hemangioendotelioma murino não metastático (O'Reilly *et al.*, 1997). As células EOMA são células endoteliais e tumorais que se originam, espontaneamente, em camundongos da linhagem 129 conhecidos por gerar um grande número de hemangiomas e teratomas de testículo. As células EOMA mantêm as mesmas características das células endoteliais parentais, dentre as quais podemos citar a presença da enzima conversora da angiotensina (ECA), do receptor de lipoproteína de baixa densidade acetilada (LDL), do fator de von Willebrand (FvW) e da trombospondina. Além

disso, foi demonstrado que células EOMA podem produzir os componentes da membrana basal, como o colágeno XVIII (Figura 3), de onde se origina a ES (O'Reilly *et al.*, 1997). Hemangioendoteliomas são definidos como tumores incapazes de formar metástases (Hoak *et al.*, 1971; Obeso *et al.*, 1990). Esta propriedade provavelmente está relacionada ao fato destes tumores produzirem elementos inibitórios de sua própria disseminação, como a ES que por inibir a angiogênese, dificulta a progressão de tumores secundários. Para que seja produzida a endostatina é necessário que existam nas células EOMA expressão de uma enzima geradora da endostatina, assim como de colágeno XVIII.

Sabe-se que produtos pró e anti-angiogênicos são secretados ou liberados da membrana basal no ambiente em remodelação, concomitante à ativação de cascatas ou redes enzimáticas. Os produtos dessas interações enzimáticas podem expor epítopos crípticos de proteínas da matriz extracelular que ao serem clivados poderão gerar fatores anti-angiogênicos, como é o caso da endostatina e da angiostatina (Nyberg *et al.*, 2006; Nyberg *et al.*, 2008). A angiostatina é liberada do plasminogênio por metaloproteases (MMPs), em especial uma metaloelastase de macrófago (Dong *et al.*, 1997), e a endostatina, do colágeno XVIII é liberada pela catepsina L ou pela elastase, em murinos, e por uma protease ainda desconhecida na literatura, em humanos. A identificação desta protease será a meta da pesquisa desenvolvida nesta tese.

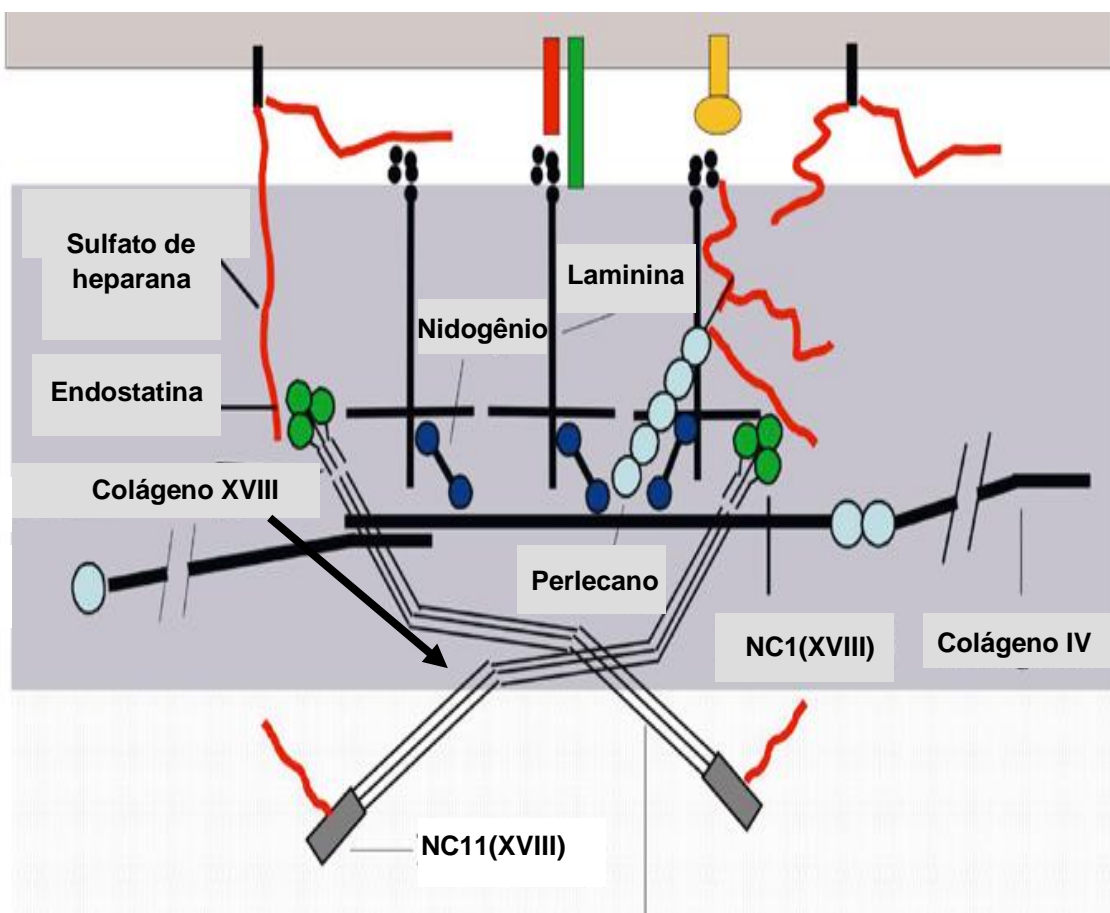


Figura 3: Representação esquemática da membrana basal. Componentes da membrana basal, dentre os quais o Col XVIII, podem ser evidenciados neste esquema (Marneros & Olsen, 2005).

Para sua contextualização, dividiremos a Introdução desta tese em três partes em que abordaremos seqüencialmente: 1) o câncer, seus determinantes, seu desenvolvimento e, especificamente, a contribuição da angiogênese para a progressão tumoral; 2) a angiogênese em si, suas etapas e as moléculas que dela participam, as estratégias para controlar a angiogênese patológica, além de revisarmos seus mais conhecidos inibidores, e, finalmente, 3) as proteases, seus tipos principais, as formas de estudo e o envolvimento com a angiogênese tumoral.

1.1. Câncer

O câncer não é uma única enfermidade, mas corresponde a um conjunto de doenças cujos determinantes biológicos compartilham características em comum, como a proliferação celular excessiva e a invasão tecidual. O câncer resulta de uma série progressiva de mutações genéticas ou epigenéticas (alterações que comprometem o produto da expressão gênica sem afetar o DNA, que se mantém intacto). As mudanças que ocorrem numa única célula são conseqüência de uma série progressiva de alterações que modificam basicamente dois tipos de genes: 1) os proto-oncogenes, genes geralmente relacionados à indução da proliferação celular, que quando mutados aumentam sua atividade, acelerando a proliferação (Luo, 2008) e 2) os genes supressores tumorais, genes relacionados à indução de morte celular, como o *p53*, cujo produto, a proteína p53, aborta a divisão celular quando encontra defeitos no DNA (Kerbel & Folkman, 2002). Mutações que comprometam o funcionamento do gene *p53*, além de acionar o fenótipo angiogênico, levam à superexpressão de *Bcl2*, gene anti-apoptótico, e à subexpressão de *Bax*, gene pró-apoptótico.

As alterações celulares na origem do câncer são acarretadas por uma série de condições provenientes de dois tipos de fatores: o iniciador e os promotores. O fator iniciador é primordial e essencial ao tumor, se antecipando sempre aos fatores promotores e promovendo sempre mutações do DNA, como deleções, translocações e inversões gênicas, por intermédio de carcinógenos químicos, oncovírus ou radiação. Fatores promotores se somam ao fator iniciador, promovendo mais mutações na célula, ou acrescentando a esta apenas as alterações epigênicas, ou ambas. A célula transformada difere da célula normal por vários aspectos sendo, um dos mais notáveis, sua capacidade de escapar de mecanismos de controle do ciclo celular, da apoptose e da ativação imunológica de seu meio ambiente, o que favorece sua proliferação descontrolada. Tal célula adquire, a partir de então, o potencial, através de sucessivas divisões celulares e posteriores mutações, de se desenvolver num *cluster*, ou nódulo, de células tumorais. Neste estágio, o tumor sólido apresenta um diâmetro em torno de 3 mm,

o que corresponderia a, aproximadamente, um milhão de células tumorais. A partir de então, seu crescimento torna-se limitado pois é dependente, unicamente, de difusão para receber oxigênio e nutrientes e eliminar seus produtos de excreção. Como consequência, as células, no centro da massa tumoral tendem a morrer por necrose ou apoptose. Acredita-se que microtumores, neste estágio, possam sobreviver por longos períodos num estado dormente, no qual o número de células que proliferam se equivaleria ao das que morrem (Folkman, 1985; Gastl *et al*, 1997).

Para um desenvolvimento posterior ocorrer, o tumor precisa adquirir novas mutações, dentre elas a que leva em direção à indução da angiogênese (Ausprunk & Folkman, 1977). Segundo Kerbel e Folkman (2002), o crescimento tumoral é estritamente dependente de angiogênese. A angiogênese tumoral torna-se possível porque as células que compõem o câncer passam a produzir fatores pró-angiogênicos, que induzem as células endoteliais dos vasos sanguíneos da vizinhança a degradar sua lâmina basal e a migrar em direção ao tumor, assunto a ser revisado na seção 1.2 deste trabalho. Uma vez que o tumor passe a ter um suprimento sanguíneo, se tornará invasivo, adquirindo um potencial para metástase com a formação de tumores secundários. Metástase é o mais temido e o menos entendido aspecto do câncer. Na verdade, o tumor só passa a ser considerado um câncer quando adquire a capacidade de invadir e colonizar sítios distantes. Esta capacidade depende, além dos fatores angiogênicos, da expressão de moléculas de adesão como as integrinas e as selectinas, permitindo a disseminação de células tumorais através dos vasos sanguíneos (Enns *et al.*, 2004). O processo de metástase envolve muitas etapas seqüenciais pelas quais uma célula tumoral deve passar, tais como: 1) escapar do tumor primário, invadindo o tecido conjuntivo subjacente; 2) entrar na corrente circulatória sanguínea e/ou linfática (*intravasation*); 3) sobreviver ao percurso no interior do sistema circulatório; 4) escapar da circulação sanguínea ou linfática (*extravasation*); 5) estabelecer uma nova colônia em órgãos distantes, a qual poderá crescer, formando um tumor secundário (Wyckoff *et al.*, 2000).

As células cancerosas começam a promover a angiogênese precocemente, assim que acionado o fenótipo angiogênico. Tal fenótipo é caracterizado pela expressão de proteínas pró-angiogênicas pelo tumor, expressão esta dirigida por oncogenes como é o caso da expressão de VEGF induzida por *c-myc* (Knies-Bamforth *et al.*, 2004). Na fase pré-vascular, tumores são não-invasivos e não-clinicamente detectáveis. O volume tumoral é restringido pela ausência de vascularização tendo em vista que a habilidade para absorver, por difusão, substâncias que circulam pelo espaço intercelular é proporcional à área de superfície tumoral (Folkman, 1971). Algumas células tumorais, geralmente as mais internas, sujeitas à escassez de suprimentos que as impedem de proliferar, se tornam inicialmente quiescentes e, mais adiante, necróticas, passando a constituir o *core* necrótico do tumor (Sutherland, 1986). Segundo Folkman & Hochberg (1973), outras duas camadas estruturam o tumor: uma intermediária, hipóxica, composta por células quiescentes, que circunda o *core* necrótico, e outra periférica, oxigenada e proliferante. Células tumorais localizadas a mais de 100 μm de distância de um vaso sanguíneo tornam-se hipóxicas. A hipóxia induz a expressão de fatores angiogênicos, como o VEGF, fenômeno mediado pelo chamado fator induzível por hipóxia (HIF-1 α). A condição de hipóxia leva à estabilização do fator HIF-1 α que passa a escapar de sua via normal de degradação intracelular a poder se ligar a HIF-1 β . O dímero de HIF-1 promove a transcrição de diversas proteínas como o VEGF (Shweiki *et al.*, 1992; Fong, 2008).

Sabe-se que agentes terapêuticos tóxicos unicamente para as células em proliferação como os quimioterápicos não atuarão nas células quiescentes subjacentes, apenas nas periféricas que proliferam. As células tumorais que proliferam podem ser erradicadas, mas as quiescentes, que se encontram subjacentes a estas, não serão afetadas e passarão da quiescência para proliferação, substituindo as que foram eliminadas (King, 1996). Associada a esta condição, as células tumorais, sujeitas a constantes mutações, geralmente expressa o gene de resistência multidroga (*mdr1*) o qual, por exemplo, geraria resistência à quimioterapia ao codificar para uma ATPase de transporte ligada à

membrana plasmática que impede o acúmulo intracelular de certa drogas lipofílicas, bombeando-as para fora da célula (Gutheil *et al.*, 1994).

De acordo com Tonini e colaboradores (2003), apesar da neovascularização tumoral, a hipóxia poderia persistir em alguns tumores. Tem sido evidenciado, clinicamente, que tumores com baixa oxigenação apresentam um prognóstico pobre em decorrência dos efeitos da hipóxia na progressão maligna. A hipóxia tem sido definida como promotora de mutações em clones celulares quiescentes, no interior do tumor, levando-os a uma condição de resistência à baixa oxigenação. Essa resistência seria devida à superexpressão de *Bcl-2*, o que promoveria a sobrevivência das células tumorais mutantes, mesmo em condições de extrema e duradoura hipóxia (Kerbel & Folkman, 2002). Segundo Semenza (2002), tumores são capazes de adaptar seu metabolismo e sobreviver sob condições de disponibilidade de oxigênio reduzidas, aumentando a glicólise e mantendo a produção de ATP. Desse modo, a camada quiescente persistiria, representando um obstáculo ao tratamento tumoral, por se constituir numa fonte de constante estímulo angiogênico.

Pesquisadores pioneiros no campo da angiogênese, como Judah Folkman, cientes de que a angiogênese é imprescindível ao crescimento tumoral e de que as células endoteliais são células geneticamente estáveis, desenvolveram o conceito de terapia anti-angiogênica, ou seja, destruição dos vasos sanguíneos que suprem o tumor visando extirpá-lo (Folkman, 1971). Tais pesquisadores preconizaram o emprego clínico dessa terapia, a princípio alternativa à convencional, para o tratamento do câncer. Diversos inibidores de angiogênese têm sido testados em pacientes nos últimos anos. Em meados do ano 2000, a endostatina entrou em fase de teste clínico (fase II), apenas 3 anos após sua primeira descrição (O'Reilly *et al.*, 1997). Os pacientes, portadores de tumores sólidos, em estágios avançados, resistentes a tratamentos convencionais, foram submetidos a doses que variavam de 15 a 600 mg/Kg/dia. Apesar do tratamento ter demonstrado uma sutil evidência anti-angiogênica, nenhuma remissão tumoral foi confirmada (Herbst *et al.*, 2002).

Embora o conceito que se tenha atualmente sobre a terapia anti-angiogênica não seja dos mais otimistas, pesquisadores continuam buscando respostas a seu insucesso terapêutico ao procurar adquirir maior conhecimento a respeito de características que compõem o ambiente angiogênico em condições normais e tumorais e de como, ou por quais enzimas, e em que fase da angiogênese seus inibidores poderiam estar sendo produzidos e poderiam atuar para obterem resultados mais eficazes ao tratamento tumoral.

1.2. Angiogênese

O conceito que se tem de angiogênese, a formação de novos vasos a partir de outros já existentes não traduz a complexidade que envolve este processo. A angiogênese ocorre como resultado do desequilíbrio entre os fatores angiogênicos, sendo o produto líquido a favor dos pró-angiogênicos, em detrimento aos anti-angiogênicos. Os fatores angiogênicos despertam interesse por parte de pesquisadores e do pessoal da área de saúde, que ainda têm deles uma compreensão obscura, no que diz respeito à fisiologia e à relação que mantém entre si. Os fatores angiogênicos se relacionam, ora se complementando, ora se excluindo mutuamente, e não podem ser dissociados sob pena de inviabilizar a progressão vascular. A matriz provisória é continuamente remodelada pelo equilíbrio entre degradação e ressíntese. Síntese e degradação dessa matriz assemelham-se intimamente com o processo que ocorre durante a coagulação e a fibrinólise, associada à coagulação. Tanto a degradação da matriz quanto a fibrinólise são finamente controladas e balanceadas por fatores angiogênicos, que atuam ora estimulando a angiogênese, ora a inibindo (Gilabert-Estellés *et al.*, 2007).

Os fatores angiogênicos são liberados em sítios em processo de vascularização e incluem: 1) fatores de crescimento, como o VEGF e FGF; 2) fatores anti-angiogênicos, como trombospondina, angiostatina e endostatina. 3) proteases, dentre as quais o ativador de plasminogênio (PA), a plasmina e as metaloproteases de membrana 2 e 9 (MMP2 e MMP9) e 4) inibidores de

proteases, como o inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e o inibidor de metaloproteases tissulares (TIMPs). Os itens 3 e 4 referente a proteases e seus inibidores serão discutidos na seção 1.3, referente à proteases.

1.2.1. Angiogênese em ambiente normal e tumoral

Procuraremos descrever, inicialmente, as etapas que compõem a angiogênese em condições de normalidade, baseando-nos nas revisões de Berger & Benjamin (2002) e de Plank & Sleeman (2003). Em 1º lugar, os fatores pró-angiogênicos, como o VEGF e o bFGF são secretados por células endoteliais, fibroblastos, pericitos e macrófagos se ligando a receptores presentes na superfície das células endoteliais, como os receptores de VEGF, Flt-1 e Flk-1/KDR e Flt-4, e os receptores de FGF, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 e FGFR6. Em 2º lugar ocorre vasodilatação com o aumento da permeabilidade dos capilares pré-existent e das vênulas pós-capilares devido à presença do VEGF. A permeabilidade existente permite o extravasamento de proteínas do plasma as quais formarão uma matriz extracelular provisória, um novo leito para migração, proliferação e diferenciação das células endoteliais ativadas. Posteriormente, as células endoteliais passam a expressar angiopoetina 2 que se liga a Tie-2, receptor tipo tirosina-quinase presente nas células endoteliais, levando à perda de adesão dos pericitos. Angiopoetinas 1 e 2 são fatores de crescimento antagonistas que competem pelo receptor Tie-2, sendo que a angiopoetina 1 tem a função de estabilizar os vasos sanguíneos. Em seguida, serino-proteases, como o ativador de plasminogênio e plasmina, e metalo-proteases, como MMP-2 e MMP-9, além de heparanases e de outras enzimas digestivas, são secretadas pelas células endoteliais. Plasmina é produzida levando à degradação do excesso de fibrina e da matriz extracelular existentes. As células endoteliais então, sob a ação dos fatores pró-angiogênicos, perdem as moléculas de adesão intercelulares ou as que se localizam entre célula e matriz, e começam a migrar em colunas sob efeito de fatores pró-angiogênicos difusíveis, fenômeno denominado de quimiotaxia. Para tanto, as células endoteliais precisam desfazer parte de seu citoesqueleto e

refazê-lo como os arcabouços de lamelipódios e filopódios, os quais se apresentam repletos de integrinas na superfície basal membranar em contato com o substrato. As integrinas se aderem à fibrina e puxam as células endoteliais em direção à maior concentração das moléculas atratoras, permitindo um movimento em função do gradiente formado pelas espécies químicas que envolvem a célula. As células endoteliais proliferam sob efeito dos mesmos fatores pró-angiogênicos atrás das pontas das células endoteliais que estão migrando. As células endoteliais se dispõem como fitas que se encontrarão nas extremidades e formarão os *loopings* ou anastomoses artério-venosas (Figura 4). Para que esse processo possa ocorrer, dois tipos complementares de ligantes da família das efrinas, Eph-B2 e Eph-B4, expressos em células endoteliais da rede arterial e venosa, respectivamente, irão se acoplar um ao outro. A partir de então, as células endoteliais voltarão a expressar complexos de adesão intercelulares formando cordões sólidos, que apresentarão lúmen ao iniciar a formação de um plexo capilar (Wang *et al.*, 1998).

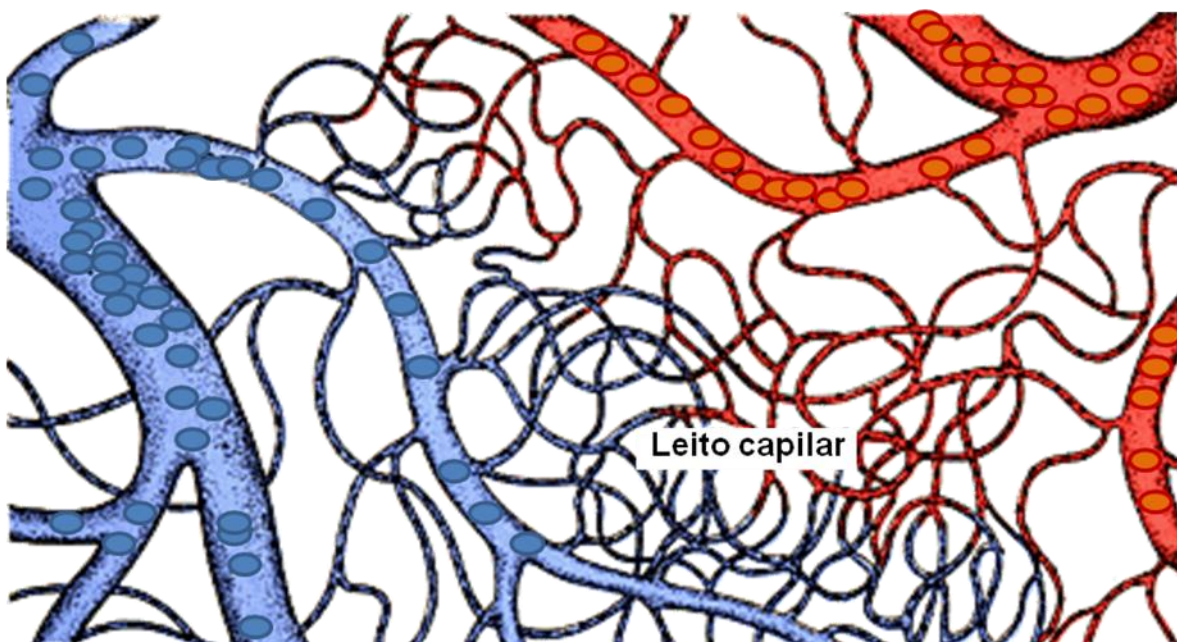


Figura 4: Anastomoses artério-venosas. Extraída do site www.unb.br/fs/clm/labcor/capilar.

As células endoteliais então passam a expressar PDGF para recrutar as células murais dos capilares, como os pericitos e as células musculares lisas. O TGF- β latente é produzido por células endoteliais, pericitos, fibroblastos e células tumorais, mas são as células endoteliais e pericitos que ativam TGF- β para que haja a maturação vascular e o retorno ao fenótipo quiescente com a produção de novos componentes da membrana basal, como laminina e colágenos IV e XVIII, que os envolverá. Os novos vasos formados serão invadidos por sangue e passarão a fazer parte do sistema vascular quiescente, marcando o final deste processo.

Embora os vasos sanguíneos, no período embrionário e pós-embrionário, sejam formados também por vasculogênese, com a atração de hemangioblastos circulantes, provenientes de sítios hematopoiéticos, a angiogênese é absolutamente essencial para o desenvolvimento embrionário e pós-embrionário, até que o organismo atinja a fase adulta. Em adultos saudáveis, sabe-se que a frequência de angiogênese é altamente restrita, ocorrendo somente no ciclo reprodutivo feminino (Reynolds *et al.*, 1992). Em condições patológicas, a angiogênese se faz igualmente presente numa gama abrangente de processos, dentre os quais: 1) os cicatriciais (Hunt *et al.*, 1984); 2) os degenerativos, como a retinopatia diabética (Sharp, 1995); 3) os auto-imunes, como a artrite reumatóide (Walsh, 1999) e 4) os tumorais (Folkman, 1971). Contudo, a angiogênese que se processa em condições tumorais se diferencia bastante daquela ocorrida nas demais condições apresentadas acima.

Desde o século XIX, anormalidades no sistema hemostático têm sido reportadas em pacientes com câncer, incluindo desordens tromboembólicas e hemorrágicas (Dvorak *et al.*, 1994). Tal questão suscita a hipótese de que as etapas angiogênicas, em ambiente tumoral, não ocorram de forma controlada e ordenada, mas se sobreponham umas às outras, desordenadamente, resultando na formação de vasos mal formados. A razão para a angiogênese tumoral diferir daquela que ocorre sob controle orgânico, em condições de normalidade, está fundamentada na necessidade tumoral por nutrientes e oxigênio que cresce

proporcionalmente ao aumento de seu volume, que por sua vez cresce ilimitadamente.

Segundo Dvorak e colaboradores (1999), os vasos tumorais são hiperpermeáveis e descritos como vazados devido, em parte, à perda de aderência entre as junções endoteliais (caderinas e PECAM-1) e de continuidade da membrana basal. Uma outra característica comum é a presença de focos de hemorragia que ocorrem espontaneamente em vasos sanguíneos tumorais, principalmente se o tumor expressa VEGF (Feng *et al.*, 2002). Os vasos tumorais tendem a quebrar todas as regras da microvasculatura, seguindo vias tortuosas, expandindo-se e mudando de diâmetro, constantemente, sem qualquer organização. Segundo Eberhard e colaboradores (2000), vasos tumorais calibrosos grandes podem ter paredes finas, típicas de capilares, membranas basais incompletas e coberturas de pericito atípicas (Figura 5). De acordo com Berger & Benjamin (2002), as aberrações estruturais descritas em vasos tumorais têm sido relacionadas a desordens funcionais e moleculares, como à superexpressão de fatores de crescimento e de integrinas. Tais pesquisadores afirmam que, embora muito esforço tenha sido feito no sentido de se procurar identificar um número crescente de inibidores e ativadores angiogênicos, muito pouco se sabe a respeito de como tais fatores interagem no processo de formação vascular, particularmente, de vasos tumorais. Segundo Dvorak (1986), tumores são considerados feridas que nunca cicatrizam por terem perdido o equilíbrio apropriado entre as forças pró e anti-angiogênicas intrínsecas aos tecidos em processo de regeneração. Em tumores, a configuração normal dos vasos sanguíneos é geralmente abolida. Uma característica típica dos vasos tumorais é a de que eles não alcançam a maturação, nunca se tornando quiescentes. Em Baish & Jain (2000) é proposta a possibilidade de que um desequilíbrio entre fatores angiogênicos seja a principal causa da estrutura vascular tumoral caótica. Nyberg e colaboradores (2008) observaram que a maior parte das células estromais presentes em carcinomas são fibroblastos com fenótipo que foge à normalidade, os quais parecem estar relacionados à angiogênese caótica, ao lado

de outras células do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos. Fibroblastos, macrófagos e neutrófilos, ao produzirem fatores de crescimento, citocinas e proteases, parecem interferir no processo angiogênico tumoral.

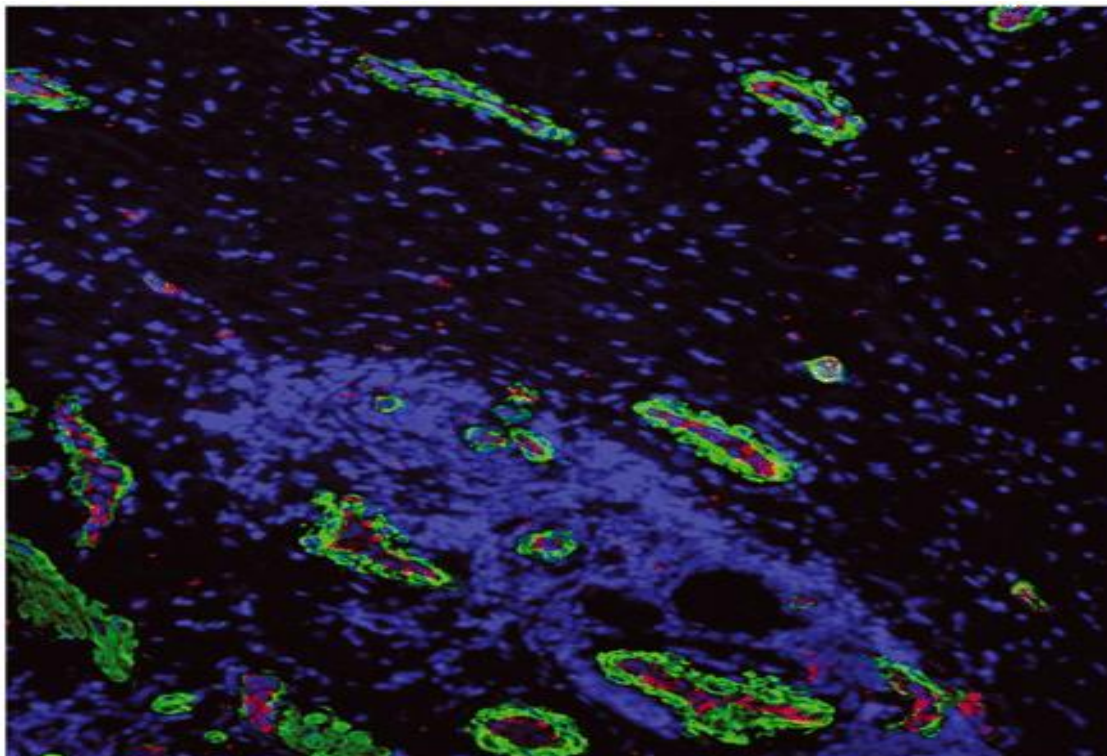


Figura 5: Imunofluorescência de vasos tumorais com dupla marcação: CD31 de células endoteliais (vermelho) e α -SMA de pericitos (verde). Micrografia mostrando vasos tumorais com células endoteliais aumentadas e com múltiplas camadas de células murais positivas para α -SMA (Peddinti *et al.*, 2007).

Thurston e colaboradores (2000) e Thurston (2002) demonstraram que vasos formados em resposta a VEGF, na ausência de angiopoetina 1, são hiperpermeáveis e inflamados. Kerbel e Folkman (2002) afirmam que a ativação do oncogene *src* leva à superexpressão de VEGF e à concomitante subexpressão de trombospondina-1. De acordo com Nagy e colaboradores (2006), VEGF, também conhecido como o fator de permeabilidade vascular, sendo mais propriamente uma citocina multifuncional, é superexpresso por tumores malignos.

Sua isoforma VEGF-A promove a hiperpermeabilidade de vasos normais ao plasma e a proteínas do plasma, sendo 50.000 vezes mais potente que a histamina. Segundo Dvorak e colaboradores (1999), a expressão, quase universal, de VEGF-A pelas células tumorais malignas leva à formação de vasos sanguíneos tumorais 4 a 10 vezes mais permeáveis a proteínas do plasma que os vasos em tecidos normais. O fibrinogênio plasmático extravasa desses vasos hiperpermeáveis, se depositando no coágulo de fibrina extravascular, o que favorece a formação da matriz provisória de fibrina.

VEGF pode interagir com 3 subtipos de receptores de membrana celular conhecidos como VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-3 (Flt-4), como representado na Figura 6. Todos esses receptores possuem um domínio tirosina quinase. A interação de VEGF com seus receptores podem ativar os seguintes circuitos ou vias de sinalização: 1) PI3K/ AKT; 2) Ras-Raf-MEK/Erk; 3) eNOS/NO e 4) IP3/Ca⁺⁺. Essas vias participam da geração de respostas biológicas específicas conectadas à proliferação, à migração, ao aumento de permeabilidade vascular ou à sobrevivência da célula endotelial, além de induzir, por exemplo, a expressão de uPA (ativador de plasminogênio tipo uroquinase), PAI-1, uPAR e MMP-1, *in vitro* (Cébe-Suarez *et al.*, 2006; Cross *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004).

Segundo Klagsbrun & D'Amore (1996), a superexpressão de VEGF, que resulta numa hiperperfusão vascular, pode promover a vascularização em áreas avascularizadas, como ocorre na retinopatia diabética. A superexpressão de VEGF foi observada em muitos tumores sólidos e anticorpos contra VEGF têm mostrado eficácia em inibir o crescimento de tumores (Lyseng-Williamson & Robinson, 2006).

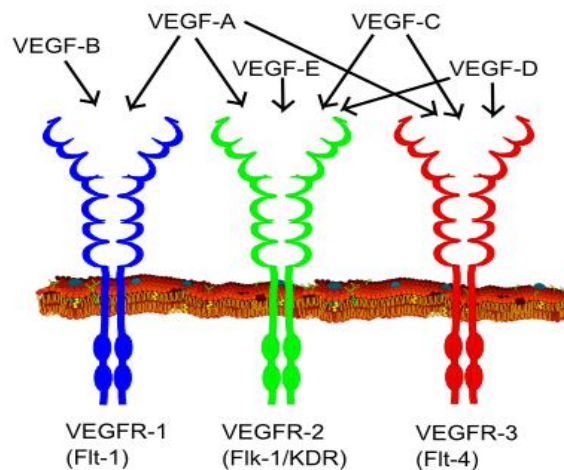


Figura 6: Isoformas de VEGF com os subtipos de receptores de VEGF de membrana celular. Nesta representação esquemática podemos observar a ligação das diversas isoformas de VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E, a seus receptores de membrana celular, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-3 (Flt-4). Representação esquemática extraída de www.wikipedia.com de autoria de Mikael Häggström (2005).

Nagy e colaboradores (2006) ao empregarem um vetor adenoviral que expressava VEGF-A (Ad-VEGF-A), em tecidos normais de camundongos, foram capazes de demonstrar a produção de um grande número de vasos, de diferentes tipos, bastante diferentes uns dos outros. Tais tipos vasculares, formados em resposta a Ad-VAGF-A, são tipicamente formados em tumores e podem ser assim relacionados: 1) vasos mãe - vasos grandes, sinusóides, de paredes finas, em forma de serpentinas, com cobertura de pericito anômala; surgem de vênulas normais preexistentes; superexpressam VEGF-A e seus receptores Flt-1 e Flk-1; 2) proliferações microvasculares glomerulóides – são *clusters* de canais vasculares pequenos ladeados por endotélio e envelopados por pericitos proliferantes e por membrana basal reduplicada; se originam dos vasos mãe; 3) mal formações vasculares – são provenientes das proliferações microvasculares glomerulóides e 4) capilares normais estruturalmente – surgem numa formação de pontes transcapilares.

Em decorrência da conformação vascular tumoral anômala, terapias anti-angiogênicas sistêmicas poderiam não apresentar o efeito esperado por atingirem o alvo tumoral de forma inapropriada. Contudo, Browder e colaboradores (2000) propuseram que mudanças do esquema e da dose terapêutica, de agentes quimioterápicos, poderiam promover o bloqueio sustentado da angiogênese. Tradicionalmente, a terapia quimioterápica se baseia na administração de doses máximas toleradas de um agente citotóxico, seguidas por intervalos livres de tratamento, os quais permitem recuperação da medula óssea e das células do trato gastrointestinal. Contudo, durante o intervalo livre de tratamento, as células do endotélio microvascular, no leito tumoral, podem reiniciar a proliferação, favorecendo o retorno do crescimento tumoral. A administração de ciclofosfamida, um quimioterápico, em intervalos mais freqüentes e numa dose mais baixa, com um breve intervalo de tratamento, induziu a apoptose sustentada das células endoteliais do leito vascular tumoral e, mais efetivamente, controlou o crescimento de tumores resistentes a drogas (Ohtani *et al.*, 2006). Da mesma forma, os inibidores angiogênicos parecem induzir apoptose celular tumoral pelo decréscimo do nível de fatores parácrinos derivados da célula endotelial que promovem a sobrevivência celular. Até o presente momento, pelo menos 20 proteínas têm sido reportadas serem produzidas pela célula endotelial nestas condições, dentre as quais: PDGF, IL-6 e fator de crescimento de epitélio ligado à heparina (HB-EGF). A produção de fatores parácrinos é decrescida devido à ação de inibidores angiogênicos que interferem com a sobrevivência da célula endotelial (Folkman, 2003).

1.2.2. Inibidores angiogênicos

Considerando-se a essencialidade da formação de novos vasos sangüíneos para o desenvolvimento de inúmeras condições patológicas, inibidores angiogênicos naturais e sintéticos têm sido pesquisados e desenvolvidos visando o emprego clínico como instrumentos importantes no combate a tais

enfermidades, dentre as quais destacamos: retinopatia diabética, retinopatia de prematuridade, psoríase, endometriose, cisto ovariano, hemangioma e câncer (Ribatti, 2008). Esta seção procura focar alguns inibidores angiogênicos, sabidamente conhecidos, que estão sendo empregados em testes clínicos visando o tratamento do câncer.

1.2.2.1. Inibidores de proteases

Existem pelo menos quatro substâncias de ocorrência natural no grupo dos inibidores teciduais de metalo-proteases (TIMP-1 a 4). TIMP-1 e TIMP-2 inibem a atividade de todas as metalo-proteases da matriz, reduzindo a angiogênese, o crescimento e a invasão tumoral e o surgimento de metástases. TIMP-3 localiza-se exclusivamente na matriz extracelular e está envolvido na regulação de etapas do ciclo celular. TIMP-4 é um regulador tecidual específico da homeostase da matriz extracelular (Mannello & Gazzanelli, 2001). As atividades destes inibidores geraram a idéia de sua utilização no tratamento do câncer, ainda que possuam uma meia-vida pequena, *in vivo*. Segundo Turk (2006), as metalo-proteases, devido a sua relevância na progressão tumoral, foram o primeiro alvo a ser considerado e diversos inibidores de metalo-proteases foram desenvolvidos. Dentre estes inibidores podemos citar batimastat (BB94, British Biotech), marimastat (BB2516, British Biotech) e neovastat (AE-941, Aeterna). Estes inibidores apresentam amplo espectro de atuação, agindo indiscriminadamente em diversos tipos de metalo-proteases, inclusive sobre as que têm papel pró-sobrevivência celular, como a ADAM e a ADAM-TS. Os inibidores de metalo-proteases, embora bem sucedidos, em testes experimentais, têm se mostrado pouco eficazes no tratamento clínico de pacientes que apresentam tumores em estágio avançado, além de pouco seguros, por levar à ocorrência de poliartrite inflamatória e de elevações de transaminases hepáticas, especialmente quando administrados isoladamente. Um outro inibidor, o TNP-470 (AGM 1470, Takeda-Abbott Pharmaceuticals), análogo sintético da fumagilina, atua especificamente

sobre a metalo-protease metionina aminopeptidase. A administração intra-tumoral e peri-tumoral de TNP-470 (50 mg/kg de peso) foi capaz de inibir completamente o crescimento de células de carcinoma tireoidianos anaplásicos transplantados em camundongos, tendo as análises imunohistoquímicas demonstrado uma diminuição significativa na densidade de capilares (Ingber *et al.*, 1990). Segundo Dezube e colaboradores (1998), a administração semanal de TNP-470 em doses de 10-70 mg/m² por infusão de 1h em pacientes com AIDS e Sarcoma de Kaposi precoce foi bem tolerada, obtendo-se respostas parciais favoráveis em 4 semanas, em média. Além disso, TNP-470 proporcionou resultados relevantes em testes clínicos levando a 50% de regressão do volume tumoral a 18% dos pacientes tratados e a uma completa e durável regressão tumoral a 5 pacientes portadores de tumores como carcinoma de cérvix uterina metastasiado para pulmão, sarcoma renal, carcinoma de células renais e câncer de próstata, após a terapia convencional ter falhado. Entretanto, o TNP-470 possui efeitos adversos importantes: em gestantes, seu uso interfere na formação da placenta, inviabilizando o desenvolvimento do embrião. Além disso, mulheres não gestantes tratadas cronicamente com a droga exibiram inibição da maturação endometrial e do corpo lúteo. Tendo em vista os efeitos colaterais importantes de TNP-470, o grupo de Folkman desenvolveu uma formulação oral, mais eficiente que a parental empregada até aquele momento, denominada Lodamina, que ao ser absorvida a nível intestinal, se acumula seletivamente em tumores (Benny *et al.*, 2008). Segundo Armstrong e colaboradores (2000), um concentrado de inibidores de serino-proteases isolados da soja demonstrou-se eficiente na fase II de testes clínicos no tratamento de câncer oral. Acredita-se que seus efeitos são decorrentes da inibição da atividade quimotríptica e tríptica de proteassomas, de forma semelhante a Bortezomib (Velcane, Millenium), um inibidor de proteassoma que foi aprovado pela FDA para o tratamento de câncer desde 2003.

Pesquisas recentes têm sido voltadas para o emprego de anticorpos neutralizantes anti-proteases envolvidas em ambientes tumorais. Alguns exemplos dessa classe de drogas têm sido desenvolvidos para o emprego em fase pré

clínica e clínica precoce dentre as quais podemos citar anti-uPA (Reuning *et al.*, 2003) e catepsina B (Premzi *et al.*, 2003 (Krka Pharmaceuticals)), para o tratamento de câncer.

1.2.2.2. Bloqueadores de moléculas de adesão célula-matriz

Recentemente, pesquisadores vêm demonstrando que fragmentos do colágeno IV, um constituinte das membranas basais vasculares, apresentam atividade anti-angiogênica ao se ligarem às integrinas, proteínas integrais de membranas celulares relacionadas à adesão célula-matriz e que se encontram presentes em células endoteliais. Inicialmente, Madri (1997) observou que as cadeias α_1 e α_2 do colágeno IV isoladas do sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm podiam inibir a proliferação de células endoteliais capilares. Colorado e colaboradores (2000) demonstraram que arresten, um fragmento de 26 kDa correspondente ao domínio NC1 da cadeia alfa 1 do colágeno IV foi capaz de inibir a proliferação, migração, formação tubular das células endoteliais e neovascularização em matrigel, funcionando como um regulador negativo da angiogênese ao se ligar à integrina $\alpha_1\beta_1$. Tais pesquisadores demonstraram, ainda, que o emprego de arresten pôde inibir o crescimento de dois tipos de tumores humanos implantados em camundongos tipo *nude* e o desenvolvimento de metástases tumorais. Kamphaus e colaboradores (2000) isolaram uma outra proteína denominada canstatin, fragmento C-terminal de 24 kDa do NC1 da cadeia alfa 2 do colágeno IV. Canstatin foi apontada como um inibidor da angiogênese e do crescimento tumoral ao se ligar às integrinas $\alpha_v\beta_3$. Canstatin suprime crescimento de tumores humanos implantados em camundongo, com histologia revelando diminuição de vasos positivo para CD31. Segundo Panka e Mier (2003), a inibição da proliferação por canstatin pôde ser observada exclusivamente em células endoteliais. Canstatin, além de inibir as etapas precoces da angiogênese, parece induzir as células à apoptose em culturas de células HUVEC, ao induzir a expressão de ligante de Fas (FasL), ativar a clivagem de pró-caspases 8 e 9 e

reduzir o potencial de membrana mitocondrial. A apoptose induzida por canstatin está associada com inibição de PI3K-AKT e parece ser dependente de eventos de transdução de sinal através de receptores de morte celular. O emprego de canstatin demonstrou suprimir o crescimento de tumores humanos implantados em camundongos, além de bloquear a angiogênese em experimentos realizados na membrana coriolantóica de embriões de galinha (Hou *et al.*, 2004). Um outro fragmento do colágeno IV de 28 kDa de sua cadeia alfa 3, denominado tumstatin, produzido por uma MMP-9, tem sido apontado como inibidor da angiogênese em experimentos em matrigel, inibindo proliferação e promovendo apoptose (Hanano & Kalluri, 2005), sem afetar o processo de migração das células endoteliais (Sudhakar *et al.*, 2003). Tumstatin parece funcionar como um inibidor específico da síntese de proteínas de células endoteliais através da interação com a integrina $\alpha_v\beta_3$ (Maeshima *et al.*, 2001 e 2002). Camundongos *knock-out* para a cadeia alfa 3 do colágeno IV ou deficientes em MMP-9 apresentaram razão de crescimento tumoral acelerado (Hanano *et al.*, 2003). Os fragmentos do colágeno IV, apresentados acima, se constituem em futuras promessas para tratamento de pacientes com câncer. Além desses bloqueadores apresentados acima, um anticorpo monoclonal humanizado anti- $\alpha_v\beta_3$, denominado vitaxin, tem sido empregado nas fases I e II de testes clínicos (Posey *et al.*, 2001). O tratamento consiste na infusão de doses de vitaxin que variam de 0,1 a 4,0 mg/Kg/semana por 6 semanas, produzindo concentrações plasmáticas suficientes para saturar o receptor $\alpha_v\beta_3$ *in vitro* (25 μ g/ml). Vitaxin demonstrou uma meia-vida plasmática apropriada, mesmo quando doses mais elevadas foram empregadas, sem qualquer acúmulo além das 6 semanas de terapia. O tratamento com vitaxin foi bem tolerado, apresentando baixa ou nenhuma toxicidade. Dos 17 pacientes tratados, 14 foram avaliados, tendo 7 desses, demonstrado doença estável por 22 meses. Tal resultado vem confirmar que a integrina $\alpha_v\beta_3$ representa um alvo anti-angiogênico relevante clinicamente para terapia prolongada no combate ao câncer.

1.2.2.3. Bloqueadores de ativadores de angiogênese

Nesta classe de inibidores angiogênicos incluímos aqueles direcionados a fatores de crescimento para as células endoteliais, seus receptores e a elementos de suas vias de transdução de sinal. No primeiro caso citamos Bevacizumab (Avastin – Genentech/Roche), um anticorpo monoclonal contra VEGF e primeiro inibidor angiogênico aprovado, nos USA, pela Food and Drug Administration, para ser empregado no tratamento de câncer de cólon (2004) e de pulmão (2006), em associação a tratamento quimioterápico convencional, e de mama (2008), como droga única. Bevacizumab tem também demonstrado atividade no tratamento do câncer renal metastásico, câncer de ovário e glioblastoma multiforme, um tipo de tumor cerebral, quando usado como agente único. A aprovação pela FDA de Avastin para o tratamento de carcinoma de célula renal está sendo esperada para 2009. Segundo Ciardiello e colaboradores (2001), os inibidores que atuam sobre os receptores tirosina-quinase interferem em vias de sinalização que culminam com a expressão de fatores de crescimento. Dentre os inibidores podemos citar ZD1839 (Iressa) OS1774 (Tarceva) e IMC225 (Erbix) que atuam sobre o receptor EGF, impedindo a síntese de VEGF, FGF e TGF- α . Singh e colaboradores (1995) demonstram que interferon- α atua sobre os receptores de interferon da célula tumoral inibindo a expressão de bFGF e também sobre a célula endotelial inibindo sua migração. Izume e colaboradores (2002) demonstraram que o emprego de Transtuzumabe (Herceptin), um anticorpo monoclonal humanizado contra o receptor tirosina-quinase do fator de crescimento epidermal humano (HER-2), superexpresso em câncer de mama, impediu a proliferação e a diferenciação celular endotelial, além de favorecer a *upregulation* de trombospondina-1. Transtuzumab tem sido empregado na fase III de teste clínicos, sendo o regime de tratamento, que o emprega, associado a Paclitaxel, um inibidor da polimerização de microtúbulos, indicado como primeiro tratamento em pacientes portadores de câncer de mama. A dosagem inicial recomendada é de 4 mg/kg de Transtuzumabe, administrado em infusão de 90 minutos. A dose de

manutenção semanal é de 2 mg/kg de Transtuzumabe e pode ser administrada como uma infusão de 30 minutos se a dose inicial for bem tolerada.

1.2.2.4. A trombospondina

A trombospondina é uma glicoproteína modular de 450 kDa descrita, inicialmente, por Baenzinger e colaboradores em 1971, sendo a sua estrutura e localização celular descritas por Lawler e colaboradores em 1978. Foi caracterizada como uma proteína secretada após a ativação de plaquetas humanas por trombina. Sua atividade anti-angiogênica baseia-se parcialmente em sua capacidade de bloquear a migração celular, a proliferação induzida por bFGF *in vitro* e a neovascularização *in vivo* (Bagavandross & Wilks, 1990; Di Pietro *et al.*, 1994). Guo e colaboradores (1997) acreditam que esta atividade inibitória esteja relacionada principalmente à sua capacidade de induzir à apoptose e inibir crescimento tumoral e metástase, tornando-a um potente inibidor da neovascularização e tumorigênese *in vivo*. A trombospondina além de ser encontrada nos grânulos α -plaquetários é também secretada por vários tipos celulares, como as células endoteliais, os fibroblastos, as células de músculo liso, as células epiteliais, os monócitos, os macrófagos, os queratinócitos, os melanócitos, os osteoblastos, os condrócitos e as células neoplásicas. A família das trombospondinas é constituída por cinco isoformas que já foram caracterizadas: TSP-1 a 5. A trombospondina 1 (TSP-1), primeira proteína a ser reconhecida como um inibidor natural da angiogênese (Good *et al.*, 1990), é uma glicoproteína multifuncional da matriz extracelular que regula vários eventos biológicos relacionados à célula endotelial como adesão, proliferação e sobrevivência celulares (Chen *et al.*, 2000; Ylikarppa *et al.*, 2003). Rodriguez-Manzaneque e colaboradores (2001) demonstraram que a superexpressão de TSP-1 em camundongos foi capaz de suprimir a cicatrização e a tumorigênese, mas se disfuncional resultava na vascularização aumentada de tecidos. A expressão de TSP-1 tem sido inversamente correlacionada com a progressão

maligna em carcinomas de mama e de pulmão e em melanomas (Zabrenetzky *et al.*,1994). As regiões da TSP-1 responsáveis pela inibição da angiogênese foram identificadas em 1993 por Tolsma e colaboradores como sendo as regiões que apresentam domínios de homologia à properdina e ao procolágeno. A seqüência CSVTCG presente no domínio de homologia à properdina, parece ser reconhecida pelo receptor CD36, receptor de células endoteliais, levando a um aumento da atividade da caspase-3, envolvida na apoptose (revisto por Bornstein, 2001). Além da interação com CD36, dois outros mecanismos têm sido propostos para a inibição da angiogênese pela TSP-1: sua ligação ao bFGF, inibindo a interação deste com os receptores de FGF e pelo bloqueio da sinalização via integrinas e receptores protéicos associados à integrina. Há evidências de que a interação desses receptores associados à integrina com o peptídeo RFYVVNWK, presente na região C-terminal da TSP-1, possa inibir a formação de estruturas tipo capilar por células endoteliais, além de bloquear a fosforilação dependente de integrinas associadas às quinases de adesão focal (revisto por Bornstein, 2001). Noh e colaboradores (2003) demonstraram que a TSP-2 apresentava, igualmente, atividade anti-angiogênica. De acordo com este grupo, injeções diárias de TSP-2 resultavam em inibição significativa do crescimento de carcinomas de células escamosas humanas *in vivo* e reduziam a vascularização tumoral. Os mecanismos apontados para a atividade anti-angiogênica da TSP-2 foram a inibição da migração celular endotelial, induzida por VEGF, e a indução de apoptose, exclusivamente, de células endoteliais.

1.2.2.5. A angiostatina

O'Reilly e colaboradores (1994), baseando-se na observação clínica de que, quando alguns tumores primários eram extirpados, o paciente era acometido por metástases, inexistentes anteriormente à cirurgia, buscaram num tipo tumoral, o carcinoma de pulmão de Lewis, uma substância que apresentasse propriedade anti-angiogênica e conseguiram isolar a angiostatina. Uma das mais promissoras

moléculas antiangiogênicas, a angostatina corresponde ao fragmento N-terminal de 38 kDa do plasminogênio, constituída pelos quatro primeiros domínios *kringle*1. Sua liberação se dá a partir da quebra proteolítica, entre os domínios *kringle* 4-5, por diversas metalo-proteases, dentre as quais uma metaloelastase (MMP-12) isolada de macrófago (Dong *et al.*, 1997). A angostatina pôde induzir à apoptose e inibir a migração e formação tubular (Claesson-Welsh *et al.*, 1998) e proliferação (Soff, 2000) das células endoteliais. O mecanismo de ação da angostatina parece estar relacionado com sua ligação à ATP sintase (Moser *et al.*, 1999), à angiomotina e à anexina II das células endoteliais, inibindo a proliferação e a migração destas células, assim como à angiopoetina 1, desestabilizando a vasculatura tumoral (Trojanovsky *et al.*, 2001). A terapia sistêmica, em animais experimentais, com a angostatina, promove a manutenção de metástases microscópicas em dormência e a inibição de diversos tipos de tumores primários em murinos C57BL6, mesmo se o tratamento começar após o tumor ter atingido 2% do peso corporal. Não foi observada toxicidade da substância até a dose testada de 100 mg/Kg/dia. Contudo, cessado o tratamento, a recorrência do tumor era registrada (O'Reilly *et al.*, 1996). A angostatina tem demonstrado inibir o crescimento tumoral numa variedade de tipos tumorais (Kirsch *et al.*, 2000) e tem sido empregada em fase I de testes clínicos como uma terapia antiangiogênica potencial no tratamento do câncer (Burke e DeNardo, 2001 e Cao, 2001).

1. Domínio *kringle* é um domínio proteico em forma de *looping* implicado na ligação do plasminogênio com fatores da coagulação. Este nome se deve a sua semelhança com um tipo de massa escandinava.

1.2.2.6. A endostatina

A endostatina, apresentada no preâmbulo da tese, fragmento carboxi-terminal de 20 kDa do Col XVIII, é o produto da protease alvo da nossa pesquisa. Vários mecanismos de ação têm sido propostos para a endostatina. Nesta subseção procuraremos apontar os que consideramos mais importantes.

A endostatina apresenta alta afinidade por heparina (Dixelius *et al.*, 2000), o que permitiu sua purificação a partir de uma coluna de afinidade confeccionada com esse glicosaminoglicano sulfatado, e alguma afinidade pelos proteoglicanos de sulfato heparana de superfície celular, os quais são implicados na sinalização por fatores de crescimento (Karumanchi *et al.*, 2001; Hohenester *et al.*, 1998 e Sasaki *et al.*, 1999). De acordo com Kreuger e colaboradores (2002), a atividade antiangiogênica da endostatina dependeria da interação entre *clusters* de arginina localizados em sua superfície e domínios sulfatados descontínuos presentes nos proteoglicanos de sulfato de heparana.

Um outro mecanismo de ação proposto para a endostatina diz respeito à inibição da atividade de proteases, como as MMPs (MMP2, 9, 13 e MT1-MMP), podendo se ligar diretamente a MMPs 2 e 9 (Kim *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Nyberg *et al.*, 2003) e ao sistema ativador de plasminogênio (Wickstrom *et al.*, 2001). Por outro lado, Reijerkerk e colaboradores (2000) apresentam um conceito inovador de atuação da endostatina ao deduzir que esta poderia participar do sistema ativador do plasminogênio desempenhando sua atividade antiangiogênica. De acordo com o modelo deste grupo, a endostatina se comportaria como os produtos de degradação da fibrina pela plasmina, que apresentam um resíduo de lisina no COOH-terminal através do qual se ligam ao plasminogênio, atuando como co-fatores, favorecendo sua clivagem pelo tPA no processo de geração da plasmina. Desse modo, a endostatina, que apresenta um resíduo de lisina no C-terminal, se ligaria ao plasminogênio, favorecendo sua clivagem pelo tPA, com excessiva produção de plasmina. Tal condição criaria um ambiente antiangiogênico, com o processo de degradação sobrepujando o de síntese e

desestabilizando a matriz extracelular provisória em formação. O fato da endostatina purificada do plasma de pacientes com câncer não apresentar lisina no COOH-terminal e não poder inibir a proliferação de células endoteliais (Standker *et al.*, 1997) é compatível com o mecanismo de ação para a endostatina proposto acima.

Bloch e colaboradores (2000), preocupados com a possível interferência da terapia com endostatina no processo cicatricial pós-operatório de pacientes submetidos a cirurgias, realizaram experimentos com camundongos Balb/c para simular esta situação. O experimento consistia na injeção de uma dose diária de 0,3 mg/kg dois dias antes da realização de incisões no dorso do animal, com a remoção de uma porção de pele, que se estendia da epiderme até a derme. Tais pesquisadores demonstraram que a endostatina não interferia negativamente nas etapas que constituem o processo cicatricial, como fechamento, contração e reepitelialização da ferida; mas, ao contrário do que se esperava, atuava positivamente, por produzir uma cicatrização de qualidade superior à ferida controle, em que não se empregou endostatina. Contudo, dados surpreendentes foram obtidos nesta pesquisa como a presença de severa anormalidade vascular com extravasamento de eritrócitos, indicando o comprometimento da integridade vascular. A análise ultra-estrutural revelou que uma grande proporção de novos vasos formados no tecido de granulação estavam estreitados ou obstruídos, o que impedia o fluxo sanguíneo normal. Desse modo, uma significativa redução no número de vasos funcionais foi observada em processos cicatriciais de camundongos tratados com endostatina. Embora, em contraste à morfologia anômala dos vasos sanguíneos, nenhuma óbvia redução na densidade dos novos vasos formados foi observada. Uma atividade mitótica elevada foi observada, o que poderia estar compensando uma possível atividade apoptótica das células endoteliais promovida pela endostatina. De acordo com essa hipótese, grupos de pesquisadores vêm recentemente encontrando evidências de que a endostatina possa também promover estimulação de etapas da angiogênese, como por exemplo, promovendo adesão via integrinas (Dixelius *et al.*, 2000; Rehn *et al.*,

2001 e Fukai *et al.*, 2002). Em células endoteliais, a endostatina parece induzir o agrupamento rápido de integrinas $\alpha_5\beta_1$ associadas a fibras de stress de actina, promovendo, ao mesmo tempo, colocalização de caveolina-1 com estas integrinas. A caveolina-1 tem sido apontada como a responsável pelo acoplamento das integrinas a cascatas de sinalização citoplasmáticas, inibindo a migração de células endoteliais pelo bloqueio da via de sinalização Ras-Raf-ERK1/p38 (Wary *et al.*, 1998). Trabalho recente tem mostrado que uma região específica da endostatina humana rica em arginina poderia interagir com a integrina β_1 na superfície de células endoteliais e inibir a migração celular e a formação tubular, através de domínio independente de RGD (Wickstrom *et al.*, 2004).

Estudos recentes têm reportado que a endostatina poderia interferir em outros tantos mecanismos de ação, tais como: 1) inibição da transdução de sinal induzida por bFGF, 2) bloqueio da motilidade celular endotelial (Dixelius *et al.*, 2002), 3) indução da apoptose (Dhanabal *et al.*, 1999), causando parada da fase G1 do ciclo celular de células endoteliais ao inibir ciclina D1 (Hanai *et al.*, 2002), 4) bloqueio da sinalização mediada por VEGF através de uma interação direta com receptor KDR/Flk-1 em HUVECs (Kim *et al.*, 2002) e 5) bloqueio da ativação induzida por TNF- α da quinase do N-terminal de Jun, impedindo a expressão de genes pró-angiogênicos dependentes desta protease (Yin *et al.*, 2002). Em Shichiri e Hirata (2001), demonstrou-se que a endostatina rapidamente subexpressa muito genes em células endoteliais em crescimento incluindo genes de resposta precoce imediata, genes relacionados ao ciclo celular, genes reguladores de inibidores da apoptose, levando também à redução de MAPKs, FAKs, receptores acoplados a proteína G que medeiam o crescimento celular endotelial, fatores mitógenos, moléculas de adesão e componentes estruturais da célula.

Tem sido mostrado, ainda, que a endostatina pode existir como uma forma globular solúvel ou como uma forma insolúvel com abundantes folhas- β que

se agregariam em depósitos amilóides, inibindo a angiogênese (Kranenburg *et al.*, 2003).

Embora a atividade principal da endostatina seja a antiangiogênica, Kim e colaboradores (2000) observaram que a endostatina pôde igualmente inibir o crescimento tumoral não apenas por atuar sobre as células endoteliais, mas também por reduzir diretamente a migração de células de carcinomas. Além disso, a *intravasation* (passo chave para metástase tumoral) de células de carcinoma oral tem sido demonstrada ser inibida pela endostatina (Nyberg *et al.*, 2003).

A administração de endostatina recombinante murina (rmES) em camundongo visando a regressão de um tipo de tumor de pulmão, tumor de Lewis, implantado subcutâneamente, levou à completa remissão tumoral (O'Reilly *et al.*, 1997). A rmES apresenta exatamente a seqüência N-terminal HTHQDFQP a qual corresponde à da endostatina que foi originalmente isolada do meio condicionado de células EOMA, produto da clivagem de uma ligação Ala-His na região em dobradiça do NC1 (O'Reilly *et al.*, 1997).

Boehm e colaboradores (1997) demonstraram que a administração de 20 mg/Kg/dia de rmES, através de ciclos repetidos de tratamento, em camundongos portadores de tumores experimentais, como o carcinoma de pulmão de Lewis, o fibrossarcoma T341 ou o melanoma B16F10, promovia a quase completa remissão desses tumores. Estes permaneciam em estado de dormência e o tratamento continuado não induzia o aparecimento de resistência, como muitas vezes observado nos tratamentos clássicos com quimioterápicos.

Em 1998, Boehm e colaboradores concluíram que a ligação da endostatina a um átomo de Zn^{++} seria essencial para seu papel anti-angiogênico. Essa hipótese está de acordo com a formulada por Ding e colaboradores (1998), de que o N-terminal da endostatina seria estabilizado pelo Zn^{++} e este, por sua vez, pela presença das histidinas 1, 3 e 11 e do ácido aspártico 76 (Figura 7). Agentes quelantes de Zn^{++} levariam à degradação da endostatina por proteases contaminantes que reconheceriam preferencialmente a endostatina não ligada a Zn^{++} . Tal hipótese foi confirmada ao empregarem mutantes de endostatina, que

não continham o átomo de Zn^{++} , os quais não puderam promover regressão do carcinoma de pulmão de Lewis.

```
AAQPARRARRTKLGTELGSPGIPSGVRLWATRQAMLGQVHEVPEGWLIFVAEQE
ELYVRVQNGFRKVQLEARTPLPRGTDNEVAALXPPVVQLHDSNPYPRREPPHPT
ARPWRADDILASPPRLPEPPYPGAPHHSSYVHLRPARPTSPPA~HSHRDFQPVL
HLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRRA
DRAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSGDKDVLRHPTWPQKSV
WHGSDPNRRRLTESYCETWRTEAPSATGQASSLLGGROLLGQSAASCHHAYIVL
CIENSFMTASK
```

Figura 7: Seqüência primária do NC1-humano. A representação esquemática apresenta uma seqüência de letras que corresponde aos aminoácidos constituintes do NC-1 do colágeno XVIII. Os aminoácidos em laranja, alanina (A - P1), prolina (P - P2), prolina (P - P3) e serina (S - P4), antecedem o ponto de clivagem na geração da endostatina humana. A seqüência em vermelho corresponde à endostatina com a presença de três histidinas (H), nas posições 1, 3 e 11, e de um ácido aspártico (D), na posição 76, em negrito, em seu N-terminal, responsáveis por abrigar um átomo de Zn^{++} , o que parece ser indispensável para a atividade anti-angiogênica que desempenha.

Sabe-se que diferentes peptídeos derivados da clivagem do C-terminal do colágeno XVIII têm sido isolados do soro de indivíduos sem câncer (Ständker *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1998). Contudo, tais peptídeos são mais curtos (18.5 kDa) ou mais longos (23-26 kDa) do que a endostatina original de 20 kDa isolada de EOMA (O'Reilly *et al.*, 1997) e não promovem inibição da proliferação celular endotelial (Ständker *et al.*, 1997). A falta de atividade antiangiogênica de fragmentos circulantes humanos tipo endostatina indica que esta poderia estar sendo degradada além de seu sítio de produção.

Abdollahi e colaboradores (2004), interessados nos mecanismos moleculares resultantes da interação da endostatina com a célula endotelial de endotélio microvascular humano, observaram que as vias de sinalização que governam suas atividades pró-angiogênicas estão subexpressas e que, ao mesmo tempo, muitos genes antiangiogênicos são superexpressos nestas células. O emprego de técnicas da biologia molecular como *microarrays*, que permite a investigação de 95% do genoma destas células, acopladas com RT-PCR e análise de fosforilação, possibilitou avaliar o efeito da endostatina sobre estas células endoteliais. A atuação de endostatina reduziu a expressão de proteínas como Jun B, HIF-1 α , neuropilina, EGFR, dentre outras, se contrapondo à ação estimulatória de certos oncogenes, como *c-myc*, por VEGF e bFGF, além de promover a superexpressão de trombospondina 1, do inibidor de HIF-1 e de esfingomielinase, um regulador de apoptose da célula endotelial. Surpreendentemente, 13% da expressão gênica foram alteradas na presença de ES, o que indica que a endostatina poderia desempenhar um papel na homeostase do câncer em humanos. Primeiramente, pôde-se verificar que a incidência de tumores sólidos entre indivíduos com Síndrome de Down é menor do que na população em geral (Hasle *et al.*, 2000). Tendo em vista que o gene do colágeno XVIII está localizado no cromossomo XXI, a proteção tem sido atribuída ao maior aumento na produção da endostatina. Tal fato se baseia na observação de que níveis de fragmentos tipo endostatina circulante são maiores em indivíduos com síndrome de Down (Zorick *et al.*, 2001). Corroborando este dado, Iughetti e colaboradores (2001) observaram que mutações no colágeno XVIII na região codificadora da endostatina estão associadas a uma maior incidência de adenocarcinoma prostático. Observou-se ainda que o nível de peptídeos séricos tipo endostatina está aumentado no soro de pacientes possuidores de vários tipos tumorais (Feldman *et al.*, 2002; Susuki *et al.*, 2002). Confirmando a importância de endostatina na prevenção de tumores, foi demonstrado que camundongos engenheirados que super expressavam o colágeno XVIII unicamente nas células endoteliais apresentavam um aumento de 1,6 vezes nos níveis de endostatina sérica associado a uma redução em 3 vezes

na razão do crescimento tumoral (Sund *et al.*, 2005). Tem sido sugerido que os tumores pancreáticos, descritos como cirrosos e avasculares, podem produzir inibidores da angiogênese que suprimem crescimento vascular e metástase. Além disso, a presença de endostatina só pode ser observada no pâncreas tumoral, nunca em pâncreas normais (Brammer *et al.*, 2005). No processo de formação da retina, vasos sanguíneos fetais provisórios adentram o olho através do nervo óptico, os quais recebem o nome de *vasa hialoidea* ou vasos hialóideos. Tais vasos sofrem regressão no período pré-natal. Contudo, tal regressão não é observada na síndrome de Knobloch, persistindo os vasos hialóides na vida pós-natal. Segundo Duh e colaboradores (2004), tal persistência pode ser explicada por uma deficiência de endostatina característica nesta síndrome, conseqüente a mutações no gene do colágeno XVIII.

As evidências explanadas anteriormente levam-nos a acreditar na existência de uma protease geradora de endostatina sendo expressa especialmente em sítios angiogênicos e tumorais precoces cuja atividade poderia influenciar o desenvolvimento de tumores sólidos. Tal protease é alvo de nossa pesquisa.

1.3. Proteases

Ao ser declarada em 2003 a finalização da decodificação pelo Projeto Genoma de quase totalidade dos genes humanos, a comunidade científica mundial pode tomar conhecimento de que o genoma humano é composto por aproximadamente 30.000 genes e destes, 553 genes codificam para proteases (Puente *et al.*, 2003).

Para o pleno conhecimento de uma dada protease, informações indispensáveis necessitam ser adquiridas de modo a classificá-la de acordo com a classe (serino, treonino, aspartil, glutamil, cisteíno, ou metaloproteases), a localização em relação à célula (extracelular, intramembranar ou citoplasmática), bem como com relação às propriedades bioquímicas (Overall & Blobel, 2007). As propriedades bioquímicas a serem analisadas incluem: o perfil de inibição e de

ativação, pH ótimo, preferência de sítio de clivagem, cinética de clivagem, relação e sítios externos acessórios à catálise. Tais características de uma dada protease constituem sua impressão digital.

Através da análise comparativa do genoma humano e murino, com o auxílio da bioinformática, pôde-se conhecer o degradoma murino e humano, ou seja, o conjunto de suas proteases, bem como verificar que a maioria das proteases são ortólogas entre essas duas espécies. Sabe-se que a espécie humana possui 566 proteases, assim distribuídas: 273 proteases extracelulares, 16 intramembranares e 277 intracelulares, números que não se afastam muito dos da espécie murina. O camundongo possui 341 proteases extracelulares, 16 intramembranares e 287 intracelulares perfazendo um total de 644 proteases, 78 proteases a mais do que o homem e, a maioria, atuando extracelularmente. As proteases intramembranares, proteínas integrais de membrana, apresentam-se em quantidades iguais entre as espécies humana e murina e se localizam nas membranas da superfície celular, do retículo endoplasmático ou mitocondrial, sendo tidas como responsáveis por regular a proteólise intramembranar (Overall & Blobel, 2007), podendo, igualmente, favorecer adesão célula-matriz, quando na superfície celular, como, também, proteólises extramembranares.

As proteases foram associadas por longo tempo exclusivamente à função de degradação completa do substrato, como a que ocorre no processo de digestão dos alimentos. A partir de 1955 com o trabalho de David e Neurath relacionado à ativação do tripsinogênio e o de David e Ratnoff (1964) e de MacFarland (1964) que versavam sobre o mecanismo de coagulação sanguínea, o conceito de proteólise teve sua compreensão expandida. Atualmente, relacionamos proteólise a uma atuação da protease de forma direcionada e controlada, associada mais adequadamente ao processamento do que à degradação indiscriminada de seus substratos. O mecanismo de coagulação e os sistemas ativador do plasminogênio-plasmina e renina-angiotensina elucidam exemplarmente a atuação em cascata de proteases ao realizar o processamento

paulatino e sequenciado de substratos até a geração de um produto ativo, fundamental para a manutenção da homeostase corporal.

Quando as proteases são expressas de forma inapropriada, temporal, espacial ou quantitativamente, podem gerar anomalias. Proteólise tem sido associada de forma primordial a câncer, como também a doenças cardiovasculares, inflamatórias, neurodegenerativas, virais e parasitárias. Sabe-se que 5 a 10% de drogas farmacêuticas são direcionadas ao controle da atividade de proteases. A ciência moderna possui um profundo interesse no entendimento da função de proteases em condições normais e patológicas, não apenas objetivando criar novas estratégias para bloquear proteases desreguladas, como também amplificar seus efeitos benéficos na cura de doenças. Turk (2006) afirma que para se identificar a função de uma dada protease num dado processo biológico e para se entender a sinalização de proteases na saúde e na doença, faz-se necessário conhecer a identidade de seus substratos fisiológicos, o que chamamos de degradoma de uma protease. Contudo, tal repertório não é suficiente para se fazer o retrato completo de uma protease porque em adição ao efeito imediato sobre um substrato direto seguem-se outros tantos *downstream* na via de sinalização. Logo, entender os efeitos *downstream* e a complexidade das cascatas de proteases é um desafio e parte crucial na seleção e validação de uma protease como alvo terapêutico.

Proteases representam uma fonte promissora de biomarcadores que têm a capacidade de evidenciar alterações precoces no estado de equilíbrio orgânico. Ainda segundo Turk (2006), para que proteases sejam selecionadas e validadas como alvo de drogas terapêuticas, além de conhecer os substratos é necessário compreender a regulação e a bioquímica que relacionam estrutura e função, seu mecanismo de atividade e o complexo processo biológico do qual participam em situação de normalidade. Uma vez obtida a caracterização de uma protease em condições fisiológicas normais, o passo seguinte seria procurar entender como as propriedades dessa protease são modificadas em estado de doença.

Overall & Blobel (2007) afirmam que a identificação de um determinado par de protease-substrato só será possível se as características próprias de uma determinada protease, forem previamente conhecidas. E, complementa dizendo que os dois maiores desafios comumente encontrados pelos pesquisadores que estudam proteases são a identificação da enzima responsável por clivar um particular substrato *in vivo* e a busca de outros substratos e funções biológicas a esta associados. Segundo estes pesquisadores, mais de uma protease pode processar um dado substrato *in vitro*. Contudo, tal questão levanta a polêmica de qual delas seria a capaz de atuar sobre este substrato *in vivo*. Uma vez, sendo esta identificada, novas questões emergem, tais como: quais são seus outros substratos e se estes poderiam limitar seu potencial como um alvo de drogas ou, até mesmo, relegá-la a uma condição de anti-alvo.

Uma vez determinado o sítio de clivagem consensual para uma determinada protease, a aquisição deste conhecimento pode ser usado para pesquisa de novos substratos. Candidatos a substratos podem ser descobertos em bancos de dados que arrolam as seqüências primárias de todas as proteínas conhecidas. A bioinformática, ferramenta costumeiramente utilizada por pesquisadores por permitir consulta facilitada a estes dados, apresenta duas limitações importantes: 1) aponta vários possíveis candidatos a substratos, a maioria dos quais apresentando conformação que inviabilizaria a catálise, pois o sítio de reconhecimento estaria inacessível ao ataque proteolítico e 2) não seleciona substratos que são clivados em sítios que não são cineticamente ótimos. Contudo, a sutileza lógica associativa permite concluir que muitas vezes uma cinética mais lenta *in vitro* ou uma baixa razão k_{on}/K_m , ou seja, uma baixa afinidade da protease pelo substrato constitui-se num pré-requisito indispensável para que uma dada protease, preterida por uma análise superficial e mecânica, seja eleita a mais adequada para exercer uma dada função fisiológica. Como exemplo, poderíamos citar metalo-proteases que clivam lentamente o colágeno nativo, permitindo a homeostase e a integridade orgânicas durante o processo de remodelamento tecidual.

Desse modo, atividades proteásicas muito baixas podem ser confirmadas *in vitro*, empregando, por exemplo, o método ICDC (*inactive-catalytic-domain-capture*), que consiste em se criar um mutante de uma determinada protease, cujo sítio catalítico foi inativado, a qual é imobilizada em fase sólida, funcionando como isca para ligação de um particular substrato (Overall *et al.*, 2004). A seguir, o complexo protease-substrato formado é sequenciado por espectrometria de massa. Tal método, além de validar um par de protease-substrato pouco provável de existir, pode impedir, em extratos celulares, onde outras proteases co-purificadas, co-fatores e substratos estão presentes, uma falsa interpretação dos dados obtidos, evitando atribuir a uma pseudo-protease a catálise de um dado substrato.

O emprego de outros tantos métodos de proteômica são igualmente úteis no processo de capturar pares de proteases-substratos, *in vitro*, tais como: 1) cromatografia de afinidade em que inibidores proteicos irreversíveis, marcados com *flags*, grupamentos evidenciadores, são associados à matriz da coluna utilizada; 2) géis nativos, de atividade, empregando peptídeos fluorogênicos como substratos. Após a reação com peptídeo fluorogênico, a banda que fluorescer, estará sinalizando que ali houve catálise. Em seguida, esta banda poderá ser recortada e injetada num gel de poliacrilamida desnaturante, e a banda ou bandas resultantes desse gel serão seqüenciadas por espectrometria de massa; 3) cromatografia de gel filtração que separa, por peso molecular, proteínas-substrato candidatas, que foram previamente incubadas com uma dada protease. Tais proteínas-substrato poderão ter resíduos de cisteína marcados com isótopos radioativos, bem como com outro marcador. A seguir, substratos e produtos, caso existentes, serão sequenciados. Além de análises bioquímica e de proteômica, métodos genéticos são importantes por evidenciar funções de proteases e desvendar substratos naturais. Como exemplo poderíamos citar a técnica em que a expressão de um gene é silenciada, conhecida como *knock-out* e em que uma seqüência de cDNA codificadora para uma determinada proteína é inserida num locus cromossômico particular, denominado por *knock-in*. Contudo,

pesquisadores atuais chamam atenção para o fato de que *Knock-out* e *knock-in* de um único gene podem afetar a expressão de outros genes, os quais podem mascarar ou compensar ou, até mesmo, potencializar o efeito esperado de catálise em relação a um dado substrato, inviabilizando a confiabilidade de resultados no processo de detecção de um novo par protease-substrato.

Pesquisadores atuais, se abstendo de manipulações genéticas, podem tirar proveito do perfil diferenciado de proteases em estados de normalidade e de enfermidade, que alteram tanto a frequência de expressão quanto as propriedades de proteases, para desvendar novos pares de proteases-substratos. A relevância de se buscar novos pares de proteases-substratos se deve ao fato de que isto se constitui no primeiro passo em direção ao conhecimento de intrincados mecanismos relacionados a proteólises, em especial as que ocorrem em ambientes hemostáticos e angiogênicos, os quais são fundamentais para a progressão tumoral.

1.3.1. Proteases em sítios angiogênicos e tumorais

O amplo rol de substratos de membrana basal e de matriz extracelular e as proteases que irão processá-los necessitam ser mapeados como primeiro passo na busca de se restaurar a normalidade orgânica sempre que proteases estiverem compondo contextos de desequilíbrio, como no câncer. Desse modo, não poderíamos falar de pares de proteases-substratos sem associá-los a proteólises relacionadas à angiogênese e a tumorigênese (Collen *et al.*, 2003). A caracterização de novos pares de proteases-substratos permitiu-nos conhecer, por exemplo, que a angiogênese está intimamente associada ao sistema hemostático e que este, por sua vez, é constituído por uma cascata proteolítica que culmina com a formação da fibrina, substrato primeiro para migração das células endoteliais. A seguir a fibrina será inserida num complexo contexto hemostático e angiogênico dimensionado, em condições tumorais, por uma rede proteolítica representada por todas as classes de proteases. Desse modo, a coagulação sanguínea, que envolve a ativação seqüencial de uma série de serino-proteases,

levando à formação de uma matriz provisória de fibrina, representa etapa fundamental à angiogênese e a tumorigênese. Por associação lógica, poderíamos dizer que nem os ambientes reparadores tissulares nem os tumorais podem ser dissociados dos componentes do sistema hemostático, mas apenas diferem em magnitude de estímulos e de respostas. Desse modo, as proteases presentes em ambientes tumorais estarão de alguma maneira entrando em contato com os componentes do sistema hemostático ou, ainda, poderão dele estar fazendo parte diretamente. A seguir procuraremos apontar as mais conhecidas proteases presentes em ambientes angiogênicos e tumorais, incluindo neste rol os proteassomas, protease presente em ambiente tumoral e identificada pelo nosso grupo como a geradora *in vitro* da endostatina humana.

A angiogênese, como discutida anteriormente, é controlada pelo balanço entre promotores, como VEGF e FGF, e inibidores angiogênicos, como trombospondina-1, angiostatina e endostatina. Sabe-se que VEGF e FGF podem induzir a expressão do ativador de plasminogênio tipo tecidual (tPA) pelas células endoteliais. A plasmina, gerada na superfície celular, pode levar à ativação de metalo-proteases, liberação de fatores de crescimento latentes, proteólise de glicoproteínas de membrana e degradação da matriz extracelular (McColl *et al.*, 2003). A formação de plasmina é essencial para a invasão e migração das células endoteliais no tecido a ser vascularizado. A plasmina causa proteólise da matriz extracelular e fibrinólise, degradando fibrina e formando os produtos de degradação da fibrina. O sistema tPA-plasmina é o principal sistema responsável pela fibrinólise, estando também envolvido na regulação do *turnover* de vários componentes da matriz extracelular, em condições normais e patológicas, incluindo a invasão cancerosa (Saksela *et al.*, 1988). Este sistema contribui também para a degradação de proteínas de matriz resistentes à sua ação, como o colágeno nativo, por meio da ativação de pró-MMPs, zimogênios inativos de collagenases (revisto por Parfyonova *et al.*, 2002). Segundo Pepper e colaboradores (1990 e 1993), os níveis de expressão de três componentes do sistema hemostático, tPA, PAI e plasminogênio, são aumentados em células com

alta capacidade migratória. No sistema clássico, plasminogênio, uma α -globulina ligada à matriz extracelular, é clivado por tPA através da hidrólise da ligação peptídica entre a Arg561 e a Val562, produzindo as duas cadeias da plasmina ativa, principal enzima do sistema fibrinolítico. A plasmina é uma serino-protease neutra, de ampla especificidade, que tem a capacidade de desenvolver uma extensa atividade proteolítica ao catalisar a degradação de diferentes componentes da matriz extracelular, podendo também unir-se a diferentes receptores da superfície das células tumorais, amplificando seu poder de catálise (Miles *et al.*, 1988). Hajjar e colaboradores (1994) identificaram a anexina II como um receptor para tPA e plasminogênio na superfície de células endoteliais e que tal ligação, quando simultânea, resultaria no incremento em 60 vezes da eficiência catalítica de tPA na geração de plasmina (Cesarman *et al.*, 1994). A anexina II ligada à membrana plasmática pelo lado extracelular tem sido descrita como receptor para uma variedade de diferentes ligantes, embora a interação com os elementos plasminogênicos na superfície das células endoteliais seja a mais bem caracterizada. A anexina II é expressa não somente por células endoteliais, mas também por outros tipos celulares (Gerke & Weber, 1984). Frohlich e colaboradores (1990) observaram a expressão massiva de anexina II por células em processo de proliferação. Desse modo, a anexina II é também expressa em outras células que se renovam, dentre as quais fibroblastos e células epiteliais, como as do pulmão e as do trato gastro-intestinal (Frohlich *et al.*, 1990) e superexpressa em muitos cânceres humanos (Yeatman *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 2004). Além disso, a diminuição de sua expressão em células HeLa, 293, IEC e células de câncer de colo humano resultam na ausência da proliferação (Chiang *et al.*, 1999). Por outro lado, a anexina II não é expressa por células quiescentes, como as plaquetas e hepatócitos (Frohlich *et al.*, 1990).

Pesquisadores vêm demonstrando *in vitro* que a indução da ativação do plasminogênio leva à desadesão celular (Ge *et al.*, 1992), inibição da adesão celular (Reinartz *et al.*, 1995) ou destruição da célula endotelial (Sugimura *et al.*, 1994). Além do mais, demonstrou-se que maspin, um estimulador de tPA, inibe a

angiogênese (Sheng *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000) e que a inibição de PAI-1 previne a vascularização e o crescimento tumoral (Bajou *et al.*, 1998). Tais dados parecem contraditórios, contudo sabe-se, atualmente, que o tPA apenas exerce atividade pró-angiogênica quando sua concentração não ultrapassa níveis elevados. Acima de uma dada concentração basal, tPA pára de exercer uma atividade pró-angiogênica, degradando em demasia a matriz e atuando como fator antiangiogênico (Reijerkerk *et al.*, 2000). Logo, para que a angiogênese possa continuar, seu inibidor PAI-1 deve ser produzido. PAI-1 é o representante clássico dos inibidores tipo serpina, inibidores de serino-proteases naturais, que estão presente no *front* de migração celular, desempenhando importante função ao prevenir excessiva degradação da matriz provisória de fibrina (Pepper *et al.*, 1990).

Existem ainda estudos que demonstram que cisteíno-proteases lisossomais, da família das papaínas, secretadas pela célula endotelial, como as catepsinas B e L, estão envolvidas na degradação dos constituintes da membrana basal como a laminina, fibronectina e o colágeno tipo IV (Velasco *et al.*, 1994), e que, por isso, a catepsina B pode favorecer a angiogênese (Sinha *et al.*, 1995). Em carcinoma humano de cólon, a atividade aumentada de catepsina B está associada com o incremento de atividade de MMP2, indicando que a importância de catepsina B poderia ser crucial em cascatas proteolíticas tumorais e metástases (Emmert-Buch *et al.*, 1994). Através de uma complexa cascata, a pró-catepsina B pode ser ativada pela aspartil-protease catepsina D, pelas serino-proteases elastase e uPA e pela cisteíno-protease catepsina G. Além disso, o receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase tem sido implicado no aumento de expressão de catepsina B e, por mecanismo de *feedback* positivo, a catepsina B, associada à membrana, também estaria relacionada à ativação de pró-uPA em uPA ativo (Kobayashi *et al.*, 1992). Desta forma, a catepsina B exerceria uma importante função na iniciação da cascata proteolítica que envolve uPA, plasminogênio e plasmina (Somanna *et al.*, 2002). Sabe-se que três importantes metalo-proteases, MMP2, MMP3 e MMP9, podem ser ativadas por

plasmina e indiretamente, pela catepsina B, a qual também poderia ativar, de forma direta, outras metalo-proteases (Eeckhout & Vaes, 1977).

1.3.2. Proteassomas em sítios normais e tumorais

Há onze anos, um complexo protéico tipo proteassoma foi identificado no meio condicionado de cultura de neuroblastoma por Vaithilingham e colaboradores (1998). Esse complexo tipo proteassoma apresentava uma ampla gama proteolítica e um perfil de inibição excêntrico. Possuía duas subunidades com atividade colagenolítica sobre o colágeno IV inibidas por inibidores de serino-proteases e uma subunidade inibida por inibidores de metalo-proteases incapaz de clivar colágeno, sendo seus substratos a α -caseína e a β -insulina. Proteasomas clássicos ou 26S são treonino-proteases, ou seja, um complexo proteico que apresenta resíduos de treonina em seus sítios catalíticos. Este complexo multicatalítico apresenta três principais atividades catalíticas distintas, tipo quimotripsina, tipo tripsina e tipo caspase. Embora as funções de proteassomas relacionadas à proliferação, à transcrição, à apoptose e à degradação, sejam dependentes da ubiquitinação de seus substratos, tal ubiquitinação nem sempre se faz necessária e essencial para o processamento proteico que leva à transformação de substratos inativos em produtos ativos.

Os proteassomas estão presentes em todas as células eucarióticas, podendo ser encontrados também em eubactérias e em arqueobactérias. O proteassoma 26S foi descoberto no final da década de 70 pelos pesquisadores Avram Hershko, Aaron Ciechanover e Irwin Rose. Os três cientistas foram agraciados com o prêmio Nobel de química de 2004 pela descoberta deste sistema proteolítico (Hershko, 2005). Embora a estrutura em anéis superpostos tenha sido desvendada em meados dos anos 80 por microscopia eletrônica, a análise cristalográfica das partículas 20S e 19S foram resolvidas somente em 1994 e 2004, respectivamente. Funcionalmente, o proteassoma 26S atua como uma espécie de lixeira celular, desempenhando importante papel na degradação

de proteínas desestruturadas, “gastas” e também daquelas que se apresentam em excesso (Voges *et al.*, 1999). O proteassoma 26S atua na dependência de ubiquitina e de ATP, desempenhando proteólise essencial para a manutenção da homeostase celular, a qual está relacionada a diversos processos essenciais para a célula. Dentre as funções celulares sujeitas a seu controle proteolítico, podemos citar: 1) a proliferação através da ativação do fator NF κ B, ao degradar a partícula I κ B do complexo inativo I κ B-NF κ B ou da degradação de p53, proteína controladora do ciclo celular ; 2) a diferenciação através da degradação de ciclina, desfazendo o complexo ciclina-CDK; 3) a apoptose pela degradação de proteínas ubiquitiniladas relacionadas à sobrevivência celular, além de 4) uma função imunológica, através da produção de peptídeos a serem apresentados a MHC-I.

Os proteassomas 26S são compostos pelas unidades 20S e 19S. A unidade 20S é o *core* protéico do proteassoma responsável pela atividade proteásica do complexo. Segundo o conceito clássico, os proteassomas se encontram localizados intracelularmente, no citoplasma e no núcleo celular, em especial o complexo 26S (Voges *et al.*, 1999). Contudo, segundo conceito mais moderno, o *core* protéico 20S dos proteassomas pode estar localizado na superfície externa da membrana plasmática da qual pode se dissociar e atuar extracelularmente (Sixt & Dahlmann, 2008), constituindo-se num proteassoma extracelular ou 20S. Estruturalmente, o proteassoma 20S é constituído apenas pela unidade 20S que se compõe por quatro anéis superpostos e ocos centralmente, assemelhando-se a um barril de 15 x 11,5 nm. Os sítios proteolíticos do proteassoma estão localizados na superfície interna dos anéis, o que condiciona o desenovelamento prévio à penetração de substratos sujeitos à catálise (Voges *et al.*, 1999). Os dois anéis mais internos são constituídos, cada um, por sete subunidades β e os externos por sete subunidades α . Dentre as sete subunidades β dos anéis centrais, três delas apresentam atividades proteásicas únicas e distintas, atuando, cada uma, sobre uma família ácida, básica e hidrofóbica de aminoácidos. As três subunidades β possuem as seguintes atividades clássicas: subunidade β 1, tipo caspase, cliva após resíduos ácidos;

subunidade $\beta 2$, tipo tripsina, atuando na extremidade carboxi-terminal de aminoácidos básicos e a subunidades $\beta 5$, tipo quimotripsina, quebra no C-terminal de resíduos hidrofóbicos.

O proteassoma clássico ou 26S difere do proteassoma 20S pela presença das unidades 19S que se associam a este complexo proteásico. As unidades 19S ladeiam, de forma assimétrica, as extremidades da unidade 20S e se compõem por duas partes: a base, em contato com os anéis externos do proteassoma 20S e a tampa, à qual se liga o substrato poli-ubiquitinilado. As atividades das partículas 19S são dependentes de ATP e de ubiquitina e supõem-se que estejam relacionadas às atividades de desenovelamento do substrato e da abertura do canal do *core* 20S ou a ambas. A base da unidade 19S parece, ainda, desempenhar papel na reciclagem de proteínas essenciais à fisiologia celular ao apresentar função do tipo chaperone, isto é, restauradora da estrutura e da função dos produtos do proteassoma 26S (Braun *et al.*, 1999).

O interferon γ pode modificar a constituição das subunidades proteásicas do *core* 20S ($\beta 1i$, $\beta 2i$ e $\beta 5i$) e introduzir a expressão da partícula 11s que substitui a 19S, passando o proteassoma a atuar como imunoproteassoma com a atividade proteolítica voltada para a produção de peptídeos antigênicos com alta afinidade por MHC-1 (Aki *et al.*, 1994).

1.3.3. Proteases implicadas na geração da endostatina

Em 1998, Halfter e colaboradores demonstraram que o colágeno XVIII era suscetível à clivagem por diferentes colagenases, enzimas da família das metalo-proteases. Mas, até o presente, as duas proteases apontadas como possíveis geradoras da endostatina murina, foram uma serino-protease, a elastase (Wen *et al.*, 1999) e uma cisteíno-protease, a catepsina L (Felbor *et al.*, 2000) (Figura 8). Wen e colaboradores (1999) demonstraram que a elastase apresentava a capacidade de produzir a endostatina murina, a partir do NC1 recombinante de camundongo, como também em cultura de células EOMA.

Inicialmente, esse grupo de pesquisadores, confirmou a existência de duas bandas protéicas provenientes de amostras coletadas do meio condicionado de células EOMA, uma de 38 kDa, que correspondia ao peso molecular do fragmento NC1 e uma outra de 20 kDa que correspondia ao da endostatina, em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido por *western blot*, com o emprego de anticorpo anti-endostatina. A banda de endostatina era pouco evidente quando elastatinal, um inibidor específico de elastase, era empregado. A elastase é uma protease que degrada a elastina. Este resultado pode ser questionado tendo em vista que a presença de elastase não foi confirmada em cultura de células EOMA. Contudo, elastase purificada proveniente de pâncreas de porco e bovino pareceu liberar a endostatina do fragmento NC1 recombinante murino (rmNC1). O seqüenciamento do N-terminal do fragmento deste produto de quebra demonstrou que começava com os aminoácidos HTHQDFQP, idênticos aos da endostatina murina, que apresentava atividade anti-angiogênica. A proteólise do NC1 por elastase foi revertida com emprego de elastatinal. Ainda de acordo com Wen e colaboradores (1999), outras células produtoras do colágeno XVIII não puderam produzir a endostatina quando a elastase purificada de extrato de pâncreas de porco foi administrada a suas culturas. Estes autores acreditavam que o colágeno XVIII não era um substrato adequado para a elastase e que a geração da endostatina deveria envolver mais de um passo. Possivelmente, o colágeno XVIII nativo necessitaria ser inicialmente modificado ou processado por outra enzima, gerando um fragmento menor, o NC1, suscetível à clivagem, no passo seguinte, pela enzima geradora de endostatina.

Felbor e colaboradores (2000), buscando identificar a protease responsável pela geração da endostatina, também utilizaram o modelo de cultura de células EOMA original. Segundo estes autores, as células EOMA representavam um modelo ideal para estudo do processamento do colágeno XVIII, pois possuíam tanto membrana basal quanto a atividade proteolítica que gerava a endostatina. Após a confirmação da presença de endostatina nesta cultura celular, foram adicionados os fragmentos protéicos de rmNC1 à cultura, ou a seus meios

condicionados sem soro, e observou-se que este era processado, gerando endostatina. Os testes com inibidores de proteases revelaram que apenas os inibidores de cisteíno-proteases, como leupeptina, E-64, inibidor de catepsina tipo II e LHVS podiam inibir a produção de endostatina. O LHVS na concentração de 10-500 nM, que inibe especificamente a catepsina L, pôde reduzir a síntese de endostatina.

Contudo, a universalidade destas proteases tem sido questionada tendo em vista que nenhuma delas foi capaz de liberar a endostatina do colágeno XVIII humano (Ferrerias *et al.*, 2000). Segundo Farias e colaboradores (2006), a catepsina L gera fragmentos maiores que a endostatina, de aproximadamente 32 kDa, em ensaios de incubação com NC1 humano. A elastase por sua vez estaria relacionada à degradação, e não à produção, de endostatina em pâncreas humano normal e não pôde ser detectada em pâncreas humano tumoral (Brammer *et al.*, 2005).

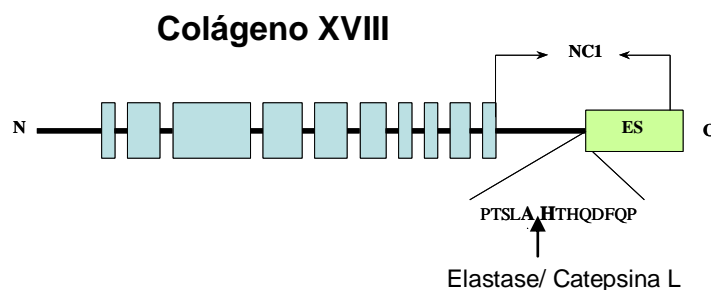


Figura 8: Representação esquemática do colágeno XVIII murino. Colágeno XVIII murino sendo clivado pelas duas proteases citadas na literatura, elastase (Wen *et al.*, 1999) e catepsina L (Felbor *et al.*, 2000). Representação esquemática de Wen e colaboradores (1999) por nós modificada.

A pesquisa relatada nesta tese objetivou desvendar a protease capaz de liberar a endostatina do colágeno XVIII humano. A caracterização e o isolamento da protease foram possíveis com o emprego de peptídeos sintéticos com fluorescência auto-suprimida (Figura 9). Tais peptídeos são moléculas sintéticas compostas, no nosso caso, por aminoácidos com as seqüências que contêm o sítio de clivagem do colágeno XVIII para produção das endostatinas murina e humana. A emissão de fluorescência destes peptídeos aumenta à medida que os grupos aminobenzóico ou Abz (grupo fluoróforo) e etilenodiaminodinitrofenol ou EDDnp (grupo supressor) se afastam pela clivagem proteolítica. Usando esse método altamente sensível, pudemos monitorar a atividade proteolítica em culturas celulares em função do tempo, após a adição do substrato.

Inicialmente, os peptídeos fluorogênicos foram adicionados a culturas de células EOMA e tal método constituiu-se numa estratégia, pois visávamos confirmar se a protease putativa geradora de endostatina em células tumorais de camundongo seria capaz de clivar a seqüência peptídica humana (RPTSPPA~HSHRQ), gerando a endostatina humana. Além disso, este método de captura da enzima geradora da endostatina era mais racional e sensível, pois oferecíamos à enzima uma seqüência intencionalmente restrita à clivagem.

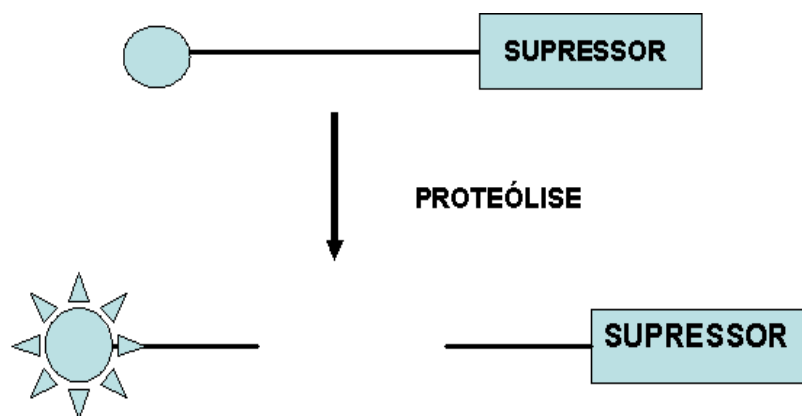


Figura 9: Proteólise de peptídeo fluorogênico. Na representação esquemática podemos observar um peptídeo fluorogênico intacto, acima, e hidrolisado, abaixo, após proteólise, com emissão de fluorescência.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral:

Identificar a protease geradora da endostatina humana, utilizando-se para isso técnicas de proteômica, tais como SDS-PAGE, *western blot*, cromatografias e análise de atividade proteásica em fluorímetro, com o emprego de peptídeo fluorogênico mimetizando o sítio de clivagem do Col XVIII na geração da endostatina, como substrato.

2.2. Objetivos Específicos:

2.2.1. Investigar se o complexo multimérico presente na fração de maior atividade de EOMA seria capaz de clivar, assim como o sobrenadante destas células, o peptídeo fluorogênico que mimetiza o sítio de clivagem na geração da endostatina;

2.2.2. Investigar se o ponto de clivagem do peptídeo fluorogênico pela protease da fração de maior atividade situa-se entre os resíduos de alanina e histidina, permitindo a geração de endostatina;

2.2.3. Investigar se esta atividade proteásica estaria presente na fração de maior atividade de tumores humanos, como astrocitomas humanos primários;

2.2.4. Investigar se a fração de maior atividade de EOMA poderia clivar o NC1 do colágeno XVIII, que apresenta uma conformação mais próxima à estrutura terciária de sua molécula parental, o colágeno XVIII;

2.2.5. Investigar se a fração de maior atividade de EOMA é capaz de clivar o colágeno XVIII;

2.2.6. Aprofundar a caracterização do complexo multimérico presente na fração de maior atividade, analisando o pI e o peso molecular das subunidades;

2.2.7. Verificar o perfil de inibição do complexo multimérico presente na fração de maior atividade de EOMA por inibidores gerais de serino-proteases e específicos de proteases tipo quimotripsina, capazes de inibir o sobrenadante destas células, de acordo com análise desenvolvida anteriormente a este trabalho;

2.2.8. Investigar se o complexo multimérico presente na fração de maior atividade poderia ser inibido por MG132, um inibidor de proteassoma;

2.2.9. Investigar se as subunidades do complexo multimérico da fração de maior atividade poderiam ser reconhecidas por anticorpo anti-subunidades de proteassoma e;

2.2.10. Seqüenciar subunidades do complexo multimérico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Culturas celulares

As culturas celulares utilizadas nesta tese, bem como os meios empregados em seu cultivo estão relacionados na tabela 1, abaixo:

Célula	Descrição	Origem	Meio de cultivo
HUVEC	cultura primária de células do endotélio de veia umbilical humana	Nosso laboratório	Meio 199 (Sigma) e SFB 20%
HMVEC	linhagem endotelial de microvasos humanos	Clonetics (Suiça)	EGM-2-MV (Sigma) com SFB 10%
GM7373	linhagem celular endotelial de aorta bovina	DSMZ (Alemanha)	MEM com aminoácidos não-essenciais 1% (Sigma) com SFB 10%
PAEC	cultura primária de célula endotelial de artéria porcina	Doada por Dr A.V. Souza, IBqM/UFRJ	DMEM (Sigma) com SFB 10%
CPAE	linhagem celular endotelial de artéria pulmonar de novilho	ATCC (USA)	DMEM (Sigma) com SFB 10%
MA-104	linhagem celular de rim de macaco	ATCC (USA)	DMEM (Sigma) com SFB 10%
CHO-K1	linhagem de célula de ovário de hamster chinês	ATCC (USA)	Ham-F12 (Sigma) com SFB 10%

Fibroblasto	cultura primária de fibroblastos de pele humana	Banco de Células do HUCFF UFRJ	DMEM (Sigma) com SFB 10%
EOMA	linhagem de hemangioendotelioma de camundongo	ATCC (USA)	DMEM (Sigma) com SFB 10%
RD	linhagem de rabdomiosarcoma humana	ATCC (USA)	DMEM (Sigma) com SFB 10%
Hep-G2	linhagem de células de hepatoblastoma humano	DSMZ (Alemanha)	MEM-Earl com glutamina 2 mM (Sigma), piruvato de sódio 1 mM (Sigma), aminoácidos não-essenciais 1% (Sigma) e SFB 10%.
SK-Hep-1	linhagem de adenocarcinoma de fígado humano	DSMZ (Alemanha)	RPMI (Sigma) com SFB 20%
Hepa 1-6	linhagem de hepatoma murino	ATCC (USA)	RPMI (Sigma) com SFB 10%
Lovo	linhagem de carcinoma de colo humano	DSMZ (Alemanha)	DMEM (Sigma) com SFB 10%
Astrocitoma	astrocitoma primário	Doado por Dr V. Moura Neto, ICB/UFRJ	DMEM-F12 (Sigma) com SFB 5% ou 10%

Tabela 1: Culturas celulares. Empregamos em nossa pesquisa culturas primárias e linhagens celulares tanto de células normais quanto de tumorais.

As células HUVECs foram obtidas em nosso laboratório por tratamento da veia umbilical humana com a enzima colagenase tipo IV e cultivadas segundo modificação da técnica descrita por Jaffe *et al.* (1973). Os cordões umbilicais foram obtidos da Maternidade Escola (UFRJ) diretamente da placenta, até 24 horas após o parto e armazenados a 4°C em frascos plásticos com PBS, pH 6,5, estéril, contendo fungizona 2,5 µg/ml, penicilina 500 U/ml e gentamicina 40 µg/ml. Em câmara de fluxo laminar vertical, a veia dos cordões era canulada nas duas extremidades utilizando-se cânulas de metal. Com o auxílio de uma seringa, foi feita a lavagem interna da veia, com PBS rico em glicose, previamente aquecido a 37 °C. As células foram descoladas da parede da veia pela adição de colagenase diluída a uma concentração de 0,1% em PBS. Os cordões foram mantidos a 37 °C por 10 minutos e após este tempo, as células foram coletadas em tubo cônico contendo meio 199 (M199) suplementado com L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sódio 0,026 M, fungizona 2,5 µg/ml, penicilina 500 U/ml, gentamicina 40 µg/ml e SFB 20%. A suspensão celular foi submetida a uma centrifugação a 180 x g durante 10 minutos e as células sedimentadas foram ressuspendidas em M199 completo e distribuídas em garrafas de cultura de 25 cm². As garrafas foram levadas à estufa a 37 °C em atmosfera com 5% CO₂ até atingirem estado de confluência. A cada dois dias as culturas foram observadas ao microscópio ótico e lavadas com PBS, seguindo-se a adição de M199 completo.

3.2. Síntese de peptídeo

Peptídeos com fluorescência auto-suprimida Abz-RPTLSLA-HTHQDF-EDDnp (camundongo) e Abz-RPTSPPAHSHRQ-EDDnp (humano) foram sintetizados pelo método de síntese em fase sólida (Hirata *et al.*, 1994), usando o procedimento Fmoc¹.

1. Procedimento Fmoc: método criado por Louis A. Carpino em 1970 em que se emprega 9H-(f)luoren-9yl(m)eth(o)xy(c)arbonyl como agente de proteção das cadeias laterais de peptídeos em formação, em síntese automatizada.

Um sintetizador automatizado de peptídeos em fase sólida (sistema PSSM 8; Shimadzu) foi usado para a síntese. Todos os peptídeos obtidos foram purificados por HPLC usando uma coluna de fase reversa, C-18, Econosil. A massa molecular e a pureza dos peptídeos sintetizados foram verificadas por análise dos aminoácidos e por espectroscopia de massa com MALDI-TOF (*matrix assisted laser-desorption ionization-time-of-light*) usando um instrumento TOFSpec E (Micromass, Manchester, UK). Soluções de peptídeos com concentração estoque 8 mM foram preparadas em DMSO e as concentrações finais para análise de ponto de clivagem, da atividade em gel de eletroforese e no fluorímetro foram de 30, 50 e 0,5 μ M, respectivamente. Os peptídeos fluorogênicos foram obtidos através de colaboração com o Dr Luis Juliano, professor da Escola Paulista de Medicina.

3.3. Medidas de proteólise

A degradação de peptídeos foi medida usando um dos seguintes protocolos. Protocolo A: Células aderentes em poços de cultura de 2 cm² em confluência foram lavadas por 10 min em meio sem soro e incubadas com os peptídeos em 2 ml de Tris-HCl, pH 7, contendo NaCl 150 mM e CaCl₂ 0,5 mM. Alíquotas de 0,2 ml foram coletadas a cada 30 min, diluídas com o mesmo tampão para 1 ml e transferidas para uma cubeta de fluorescência. As intensidades de fluorescência de cada amostra foram medidas num espectrofluorímetro (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ), usando excitação e emissão de 320 e 420 nm, respectivamente. Os valores iniciais de intensidades de fluorescência para as diferentes medidas foram normalizados entre si. Protocolo B: após serem lavadas com meio sem soro, as células foram incubadas por 20 min em 1 ml de Tris-HCl, pH 7, contendo NaCl 150 mM e EDTA 0,5 mM. Células frouxamente aderidas foram coletadas após pipetagem suave e transferidas para uma cubeta de fluorescência. A fluorescência, em função do tempo, foi observada após adição do peptídeo diretamente na cubeta contendo a suspensão de células. Protocolo C: células coletadas como no protocolo B foram transferidas para um tubo Falcon de

15 ml e centrifugadas por 5 min a 1200 rpm em centrífuga clínica (225 x g). O sobrenadante foi então colocado na cubeta e a fluorescência em função do tempo foi medida a partir da adição do peptídeo.

3.4. Inibidores de proteases

Foram empregados os seguintes inibidores: (A) de metalo-proteases: (1) phosphoramidon (PM 579,6), concentração final de 40 µg/ml (estoque a 20 mg/ml em água como solvente); (2) EDTA dissódico (EDTA-Na₂, PM 372,2), concentração final de 0,5 mg/ml (estoque a 0,5 M em água destilada como solvente); (3) orto-fenantrolina (PM 198,2), concentração final de 10 mM (estoque 200 mM em água destilada como solvente); (4) TIMP-1 (PM 28.000), concentração final de 0,02 mg/ml (estoque 0,2 mg/ml em água destilada como solvente) e (5) enalaprilato, concentração final de 10 mg/ml (estoque a 20 mg/ml em água destilada como solvente); (B) de aspartil-proteases: (1) pepstatina A (PM 685,9), concentração final de 0,7 µg/ml (estoque a 1 mg/ml em DMSO como solvente); (C) de cisteíno-proteases: (1) E64 (PM 357,4), concentração final de 10 µg/ml a partir da concentração inicial de 20 mg/ml numa mistura de água e etanol como solvente; (D) de cisteíno-proteases e serino-protease: (1) leupeptina (PM 475,6), concentração final de 0,5 µg/ml (estoque a 1 mg/ml em água destilada como solvente); (E) de serino-proteases: (1) elastatinal (PM 512,6), concentração final de 0,05 mg/ml (estoque a 1 mg/ml em água destilada como solvente); (2) PMSF (PM 174,2), concentração final de 100 µg/ml (estoque a 15 mg/ml em metanol como solvente); (3) quimostatina (PM 607,7), concentração final de 10 µg/ml (estoque a 20 mg/ml em DMSO como solvente) e (4) TPCK (PM 351,9), concentração final de 50 µg/ml (estoque a 20 mg/ml em etanol como solvente); (5) benzamidina (PM 156,61), concentração final 20 µg/ml (estoque a 20 mg/ml em água destilada como solvente) e AEBSF (PM 239,5), concentrações finais de 1 mM e 10 mM (estoque a 100 mM em água destilada como solvente) e (F) de treonino-protease e cisteíno-protease: (1) MG132 (PM 475,6), concentrações

finais de 1 mM e 10 mM (estoque a 2 mM em DMSO como solvente). Todos os inibidores de proteases empregados aqui foram comprados da Sigma.

3.5. Purificação da protease

Para a purificação da protease foram utilizadas garrafas de 75 cm², contendo culturas confluentes de EOMA. Os sobrenadantes iniciais (5 ml/garrafa) foram preparados como no protocolo C descrito na seção de medida de proteólise deste capítulo que consistiu na lavagem das garrafas com meio sem soro por 10 min seguida pela incubação destas por 20 min em tampão sem cálcio, tampão de coleta. A seguir, a suspensão celular em tampão de coleta foi removida delicadamente da garrafa e centrifugada por 5 min a 1200 rpm. O sobrenadante resultante foi concentrado em dispositivo denominado centricon YM100 (Centrifugal Filters Device; poros de 100 kDa) e centrifugado a 2.900 rpm (1000 x g) por 180 min a 4 °C em rotor S-34 para Sorvall RC-5C Plus. Ao testarmos a atividade das frações provenientes do centricon YM100, constatamos que esta estava associada à fração retida (ver Figura 20 na seção de Resultados), o que possibilita a concentração inicial do sobrenadante em 10X. As amostras de retido do centricon YM100 foram então evaporadas em speed-vac, sendo concentradas mais 10 vezes, neste processo. O sobrenadante, 100 vezes concentrado (200 µl), foi a seguir purificado em coluna de gel filtração Superose 6HR (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). Neste primeiro momento, a quantidade de proteína gerada por este processo de purificação mostrou-se insuficiente para ser seqüenciada, tendo em vista que os principais produtos do seqüenciamento correspondiam a proteínas presentes no soro fetal bovino.

Visando produzir uma maior quantidade de proteína para seqüenciamento, procuramos adaptar o protocolo de purificação descrito acima. Desse modo, 16 garrafas de 150 cm² confluentes eram lavadas por incubação das culturas por 60 min em meio sem soro seguido pela incubação por 20 min em tampão de coleta. A lavagem em meio se estendeu por 60 min para reduzir a contaminação de proteínas provenientes do soro fetal bovino. Os sobrenadantes

das 16 garrafas (10 ml cada) eram misturados e liofilizados até o volume de 2,5 ml. A amostra foi dessalinizada através do emprego de uma coluna Sephadex G25 (Amersham Biosciences) e 4 ml coletados. Em seguida, a amostra passou por uma concentração adicional em speed-vac (4 X) e foi aplicada em coluna de FPLC, Superose 6HR. A fração 6, 45 µg/ml, foi dessalinizada, seca e analisada por SDS-PAGE. Bandas coradas com *coomassie blue R*, como tubulina, actina e piruvato quinase foram cortadas do gel, eluídas e identificadas por espectômetro de massa (Figura 10).

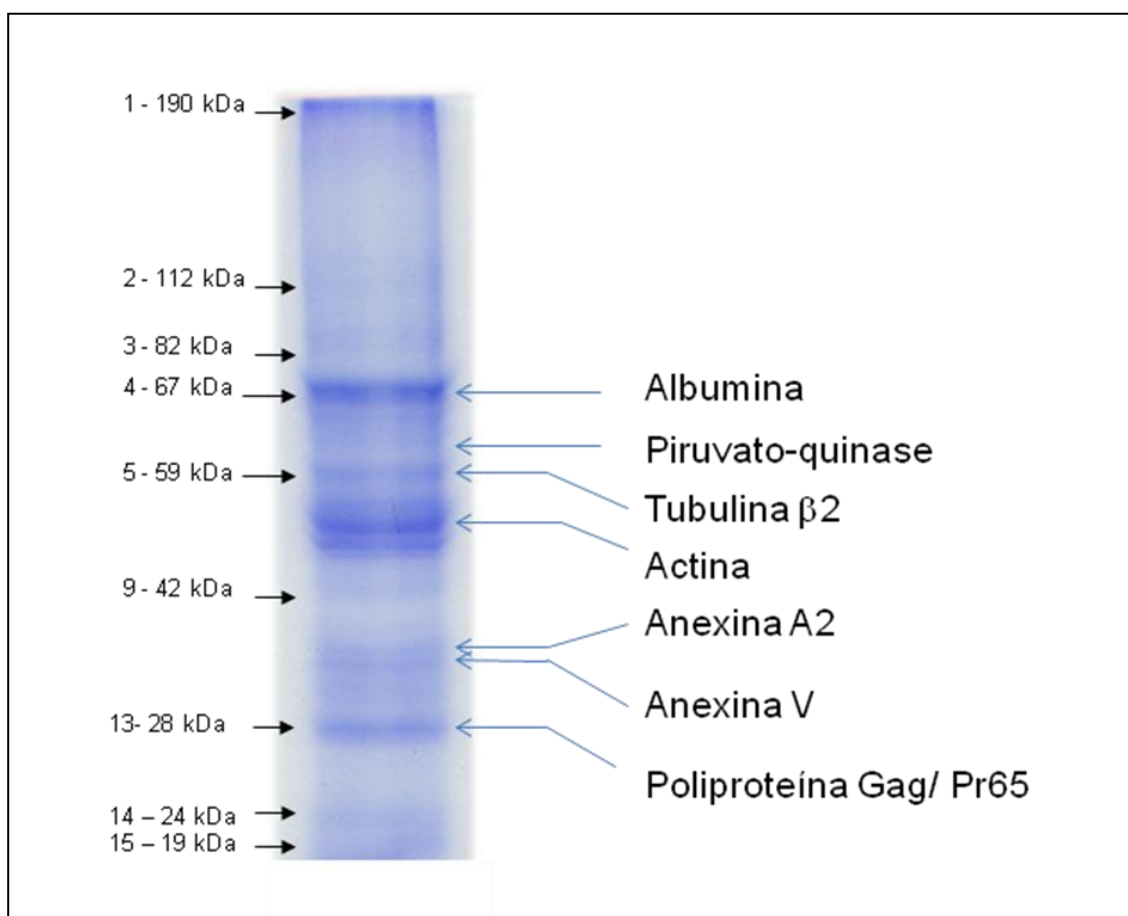


Figura 10: Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 12 % referente à fração 6. A identificação das bandas foi feita por seqüenciamento gerando os resultados indicados na figura.

3.6. Contrastação Negativa

A fração 6, purificada em HPLC, teve sua ultra-estrutura observada em microscopia eletrônica de transmissão (TEM), após preparação pela técnica de contrastação negativa. Inicialmente, uma alíquota de 30 μ l, da fração 6, em tampão Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0, dessalinizada previamente, foi depositada sobre uma grade de cobre forrada com filme suporte (Formvar). Em seguida, utilizou-se papel-filtro para remoção de excesso da gota e 30 μ l de acetato de uranila 2% foram adicionados à preparação. Ao final de 1 minuto a solução apresentava-se totalmente seca. As grades foram, então, observadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX, operado a 80 kV. Os aumentos de 50.000 e 85.000 vezes foram utilizados para estudo do material. Os resultados de microscopia eletrônica foram obtidos em colaboração com o Dr Leonardo Rodrigues de Andrade, professor do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.7. Identificação de proteínas com emprego de espectrômetro de massa

As proteínas selecionadas foram digeridas em gel, pela enzima tripsina (Trypsin sequencing grade; Promega Madison, WI, EUA), conforme o protocolo descrito pela UCSF Mass Spectrometry Facility (www.ucsf.edu) com as alterações observadas por von Krüger e colaboradores (2006). Os peptídeos foram misturados com uma matriz de ácido alfa-ciano 4-hidroxicinâmico (CHCA) em solução 50% de acetonitrila (ACN) e 1% de ácido trifluoroacético (TFA) e analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF (4700 Explorer Proteomics Analyzer, Applied Biosystem). Os espectros foram adquiridos no modo refletido, na faixa massa/carga de 800 a 4000 daltons. A acurácia das massas obtidas nos espectros considerados aceitáveis foi melhor que 50 ppm. As buscas nos bancos de dados foram feitas pela interface do programa Mascot (Matrix

Science), utilizando o banco de dados do NCBI (NCBI nr 20090117 - 7686184 seqüências)

3.8. Análise do ponto de clivagem do peptídeo

O peptídeo mimetizando a seqüência do ponto de clivagem da hES Abz-RPTSPPAHSHRQ-EDDnp foi empregado em curva de hidrólise temporal pela fração 6, tendo sido com esta incubado a uma concentração de 30 μ M a 37 oC. Alíquotas de 1 ml foram analisadas em tempos de 0, 2, 12 e 26 h e acompanhadas por fluorimetria (fluorímetro PTI, modelo Quanta Max) e por HPLC (Shimadzu Corporation). O tampão de trabalho empregado, Tris-HCl, 10 mM com NaCl 150 mM, pH 7, foi o mesmo usado para coleta da fração 6. O ensaio com o emprego de 5 ml da fração 6 + 100 μ l do substrato, foi realizado, como detalhado seqüencialmente a seguir: 1) retiramos do volume total uma alíquota de 1 ml a cada tempo, adicionando a esta 10 μ l de HCl 2N para parar a reação enzimática; 2) as alíquotas de 1 ml foram submetidas à leitura no fluorímetro sempre com a mesma diluição: 100 μ l incubado + 900 μ l de tampão Tris-HCl. Os 900 μ l restantes de cada alíquota foram avaliados por HPLC, em coluna de fase reversa C-18 (Supercosil LC-18, 46 x 250mm, para partículas de diâmetros de 5 μ m; Supelco, St.Louis, USA). Os parâmetros empregados na utilização da coluna de fase reversa C-18 foram os seguintes: 1) fase móvel - sistema de solventes: A - TFA/ H₂O (1:1000) e B – TFA/ acetonitrila/ H₂O (1: 900: 100); 2) monitoramento: λ_1 (Abz) = λ_{320} nm (excitação) – λ_{420} nm (emissão); λ_2 (EDDnp) = 365 nm e λ_3 (ligação peptídica) = 220 nm; 3) gradientes: para o tempo total de corrida de 45 min, gradiente = 25 min iniciais (10-100% B); 4) fluxo: 1ml/min; 5) finalização – lavagem da coluna: acetonitrila pura/15 min. Amostras eluídas foram coletadas a cada 45 min e aquelas contendo picos de proteína foram analisadas em espectrômetro de massa (Shimadzu Corporation, modelo UV-160A). Os picos correspondiam a três fragmentos: peptídeo inteiro, fragmento contendo Abz e

fragmento contendo EDDnp. A massa sem água dos grupamentos Abz e EDDnp correspondem aos pesos moleculares de 119 e 208,2, respectivamente.

3.9. Expressão e purificação de NC-1 marcado com myc

O RNA total de fígado humano foi transcrito reversamente a cDNA usando Superscript RT II (Invitrogen) e primer oligo dT (Promega, Madison, WI) de acordo com as recomendações do fabricante. O domínio NC1 humano [aminoácidos 1206 a 1516 do colágeno humano $\alpha 1$ (XVIII)] codificado pela seqüência (nucleotídeos 3654 a 4590, número de acesso AF018081) foi amplificado sem o códon de parada por PCR com a Taq Polimerase de DNA Platinum (Invitrogen) e a seguir, clonada “*in frame*” entre as seqüências Igk, um sinal de secreção, e a cauda myc do plasmídeo pSec Tag2 Hygro B (Invitrogen). Após o seqüenciamento o plasmídeo resultante foi transfectado com lipofectamina (Invitrogen) em células CHO-T (células CHO estáveis modificadas expressando o antígeno T maior de SV40 subsequente a transfecção anterior estável com neo pSV3, ATCC no. 37150). Após 48h, as células transfectadas foram selecionadas pela adição de 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina (Invitrogen) por 10 dias. A expressão epissomal e a secreção do domínio NC1 humano marcado com myc no C-terminal foram confirmadas pela análise de lisados celulares como também de precipitados de ácido fosfórico dos sobrenadantes de cultura em *western blot* usando tanto anticorpos específicos anti-myc (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) quanto anti-endostatina humana (AB1878, Chemicon, Temecula, CA). Células foram crescidas até confluência e então cultivadas por mais 72h em meio sem soro fetal bovino. Meio condicionado foi coletado, centrifugado e o sobrenadante sem debris celulares foi submetido à cromatografia por afinidade por FPLC em coluna de heparina HiTrap (Amrsham Biosciences). O NC-1 humano foi eluído da coluna com NaCl 0,6 M e sua seqüência será apresentada na Figura 11 a seguir.

AAQPARRARRTKLGTELGSPGIPGVRLWATRQAMLGQVHEVPEGWLIFVAEQEE
 LYVRVQNGFRKVQLEARTPLPRGTDNEVAALXPPVVQLHDSNPYPRREPPHPTA
 RPWRADDILASPPRLPEPPYPGAPHHSSYVHLRPARPT**SPPA**~HSHRDFQPVLH
 LVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQARAVGLAGTFRAFLSSRLQDLYSIVRRAD
 RAAVPIVNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSFQKDVLRHPTWPQKSVW
 HGSDPNGRRLTESYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLGQSAASCHHAYIVLCI
 ENSFMTASK**YPPPGCRWPDLEQKLISEEDLMSAVEEGPNKNSSQKRI**

Figura 11: Seqüência de aminoácidos do NC1 humano recombinante ligado a c-myc. O sítio de clivagem para geração de endostatina é representado por um til e os 4 aminoácidos que o antecedem, bem como a seqüência do próprio c-myc são mostrados em negrito.

3.10. Processamento de NC-1 recombinante

Vinte e cinco microlitros de NC-1 recombinante humano marcado com myc (97 µg/ ml) e diluído em tampão Tris-HCl, contendo NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, CaCl₂ 5 mM e MgCl₂ 5 mM, foram incubados a 37 °C com a protease purificada de EOMA (75 µl da fração 6 concentrada 100X). Após 2 horas, o meio de reação foi transferido para o gelo, seco em speedvac e analisado em *western blot* usando anticorpo anti-myc (OP10, Oncogene, Canadá), monoclonal, produzido em camundongo e empregado na diluição 1:1000.

3.11. Detecção de endostatina em meio condicionado de HUVEC

Culturas de HUVEC confluentes (em wells de 9,5 cm²) foram incubadas com a protease de astrocitoma por 2 horas a 37 °C em meio de crescimento (M199 com SFB 20%). Cem microlitros da fração 6 proveniente da Superose 6HR foram adicionados a 2 ml de meio. Meio condicionado foi coletado, dialisado contra água e seco em speedvac. Amostras foram carregadas em gel 12% de SDS-PAGE e subsequentemente analisadas em *western blot* usando o anticorpo

anti-endostatina (AB1878, Chemicon, USA), policlonal, produzido em coelho e empregado na diluição 1:100.

3.12. Detecção das subunidades do core proteico do proteassoma

Anticorpo policlonal contra as subunidades $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 1$, $\beta 5i$ e $\beta 7$ do core 20S de proteassoma, produzido em coelho (ST1053, Calbiochem, USA), foi empregado em *western blot* na diluição 1:1000. As amostras analisadas foram: 1) 30 μ l de sobrenadante total de EOMA, 2 mg/ml, distribuídos em gel nativo e em SDS-PAGE 12%; 2) 30 μ l da fração 6 de EOMA 10X concentrada, 450 μ g/ml.

3.13. Caracterização das bandas do sobrenadante de EOMA com emprego de corante *Stains-All*

O sobrenadante de EOMA concentrado em centricon YM 100 foi analisado com o uso do corante *Stains-All*, utilizando-se o protocolo de Campbell e col., 1983. As proteínas separadas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% foram fixadas por 24h em solução de ácido acético 10% e álcool isopropílico 25%. Em seguida, o gel foi lavado 4 vezes por 30 minutos com álcool isopropílico 25% para retirar todo o SDS residual e incubado com solução de *Stains-All* (0,0025% em álcool isopropílico 25%, formamida 7,5% e Tris 30 mM, pH 8,8) por 48h na ausência de luz. Para descorar o gel, foi utilizada solução de álcool isopropílico 25 %.

3.14. Detecção de banda com atividade enzimática em gel nativo de poliacrilamida

Um volume de 15 μ l de sobrenadante de EOMA não processado, 2 mg/ml, foi aplicado no gel não desnaturante de poliacrilamida 6% e a amostra correu por 1 hora a 20 mA até que o *front* de corrida atingisse a extremidade inferior do dispositivo. A seguir o gel foi incubado a 37 °C com o peptídeo

fluorogênico 100 µg/ml por 10 min sob agitação. A fluorescência emitida foi visualizada como uma banda de fluorescência laranja (415 nm) sob excitação por luz UV. O tempo de exposição para obtenção das imagens foi de 14 segundos em um transiluminador VWR equipado com uma câmera Kodak EDAS 290.

3.15. Detecção de proteassoma associado à *raft* lipídica

Alíquotas de um gradiente de sacarose de homogeneizado de 3 garrafas de 150 cm² confluentes de células EOMA foram adicionadas a 12 poços de um aparelho para *dot blot* até à saturação da membrana de nitrocelulose pertencente ao sistema. Empregamos, primeiro, o anticorpo anti-subunidades de proteassoma (ST1053, Calbiochem, USA) na diluição de 1:1000 e, após a revelação e o *stripping* do anticorpo, a subunidade B de toxina colérica conjugada a peroxidase (C3741, Sigma, USA) na diluição de 1:1000.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Degradação do peptídeo fluorogênico por várias células

Para investigar se os substratos fluorogênicos poderiam ser reconhecidos por diferentes tipos celulares, estes foram adicionados a células em cultura e a fluorescência medida em alíquotas do meio de cultura em tempos sucessivos (ver descrição do protocolo A na seção de Materiais e Métodos). Os substratos utilizados consistiam em peptídeos sintéticos fluorogênicos mimetizando a seqüência de clivagem do Col XVIII humano e murino. Em teste de atividade no fluorímetro, os tumores murinos, Hepa 1-6 e EOMA, e humanos, Lovo, HEP-G2, SK-HEP-1 e RD e uma cultura primária de astrocitoma, foram empregados. Em todos os casos foi observada uma consistente hidrólise de ambos os peptídeos, humano e murino. As linhagens RD, Hep-G2 e EOMA foram as mais ativas na clivagem do peptídeo humano, enquanto EOMA e Hep-G2 foram as mais efetivas com relação ao murino (Tabela 2 e Figura 12A). O seqüenciamento do peptídeo humano hidrolisado por células EOMA confirmou que a clivagem ocorreu após o resíduo de alanina, gerando fragmentos iniciados por resíduos de histidina (Figuras 13, 14 e 15 e tabela 3). Os picos presentes nos gráficos são relativos a massas de peptídeos analisadas por espectômetro de massa e provenientes de frações coletadas em coluna C-18 de fase reversa. As frações coletadas correspondem ao peptídeo fluorogênico inteiro, Abz-RPTSPPAHSHRQ-EDDnp e aos fragmentos Abz-RPTSPPa e HSHRQ-EDDnp, produtos da incubação do peptídeo fluorogênico com a fração 6 de EOMA, obtidos em 3 tempos diferentes.

Curiosamente, quando células endoteliais normais foram testadas, somente o peptídeo murino foi processado, enquanto nenhuma atividade foi observada com a seqüência humana. Cinco tipos adicionais de células endoteliais, PAEC, HUVEC, HMVEC, GM7373 e CPAE e 3 tipos celulares não endoteliais, MA-104, CHO-K1 e fibroblasto de pele humana primária, foram testados e nenhum

foi capaz de clivar o peptídeo humano (Tabela 2 e Figura 12A). Estes resultados demonstram que células tumorais, tanto humanas quanto murinas, produzem a protease capaz de clivar o peptídeo humano, enquanto as células normais produzem apenas proteases capazes de clivar a seqüência murina. Isto posto, nosso objetivo seguinte consistiu em identificar a protease capaz de gerar endostatina do Col XVIII humano. Desse modo, os experimentos seguintes foram realizados unicamente com o peptídeo possuidor da seqüência com sítio de clivagem humano.

CÉLULA	ATIVIDADE SOBRE O PEPTÍDEO HUMANO	ATIVIDADE SOBRE O PEPTÍDEO MURINO
Células Tumorais Murinas		
EOMA	++	++
Hepa 1-6	++	++
Células Tumorais Humanas		
RD	+++	++
HepG2	++	++
SK Hep1	+++	++
Lovo	+	+
Células Não Tumorais		
HMVEC	-	nd
HUVEC	-	nd
GM7373	-	++
PAEC	-	++
CPAE	-	++
MA104	-	nd
CHO	-	++

Tabela 2 – Listagem das células testadas e suas atividades proteolíticas sobre os substratos fluorogênicos. Na tabela as células tumorais estão marcadas em vermelho e as não tumorais em azul. Espaços pontilhados demarcam limites entre os resultados obtidos com os 3 diferentes grupos de células testadas. Os resultados apresentados são representativos de um conjunto de 3 experimentos por grupo. Os sinais de adição correspondem aos seguintes valores de fluorescência, em escala normalizada: + = 1,05-1,10; ++ = 1,10-1,20; e +++ = a partir de 1,20. Os sinais de subtração significam ausência de atividade. nd, não determinado.

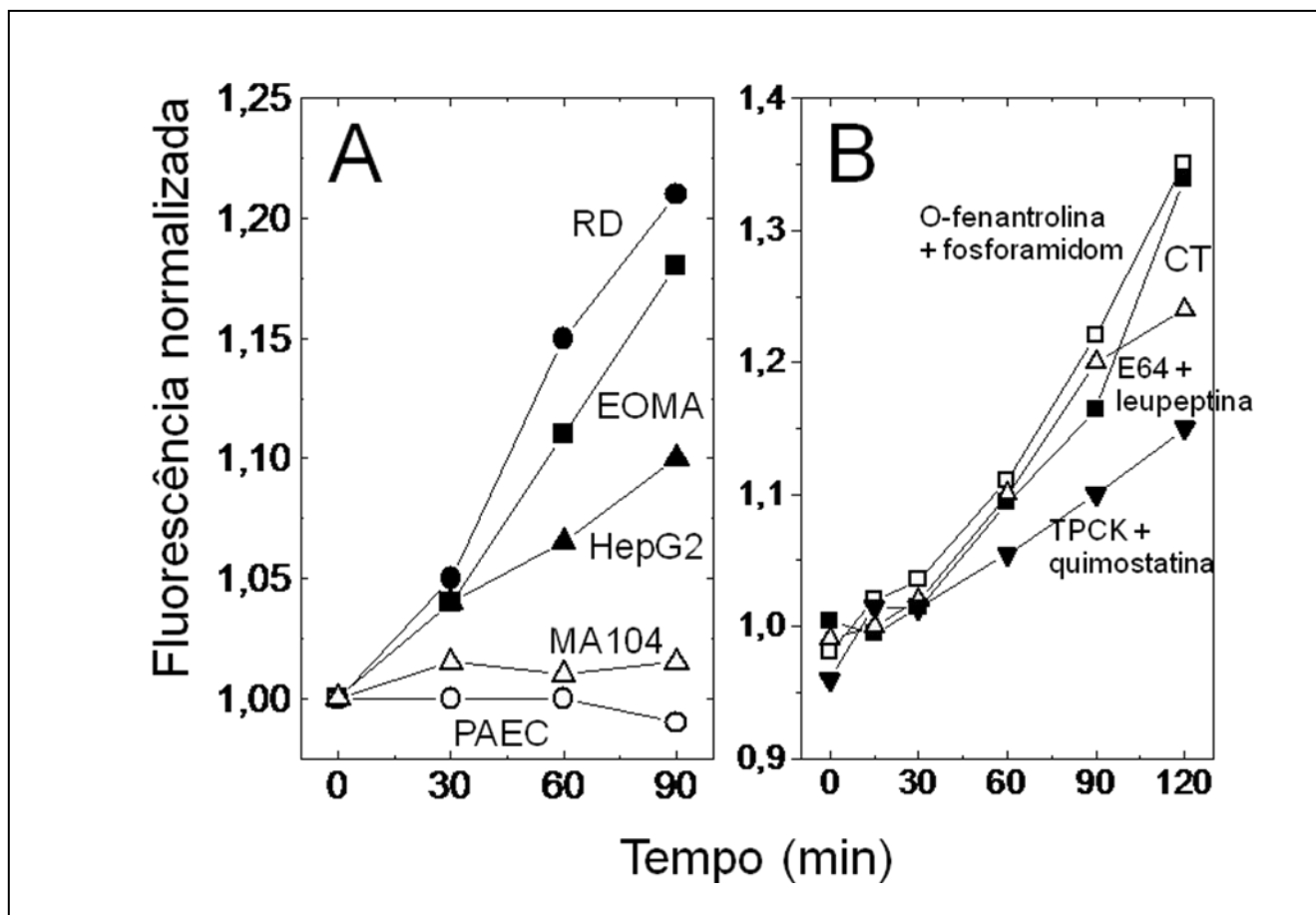


Figura 12: Gráficos demonstrativos da atividade de hidrólise do peptídeo fluorogênico humano por células tumorais e normais. Em A, apenas as células tumorais (RD, EOMA e HepG2) puderam clivar o peptídeo fluorogênico humano. As células normais testadas (MA104 e PAEC) não apresentaram atividade no teste. Em B, gráfico relativo à atividade na presença de várias classes de inibidores. Apenas TPCK e quimostatina, inibidores de quimotripsina, puderam inibir em 50 % a atividade enzimática de EOMA. Os valores iniciais de intensidade de fluorescência foram normalizados entre si. Os resultados apresentados nos gráficos A e B são representativos de um conjunto de 3 experimentos por gráfico.

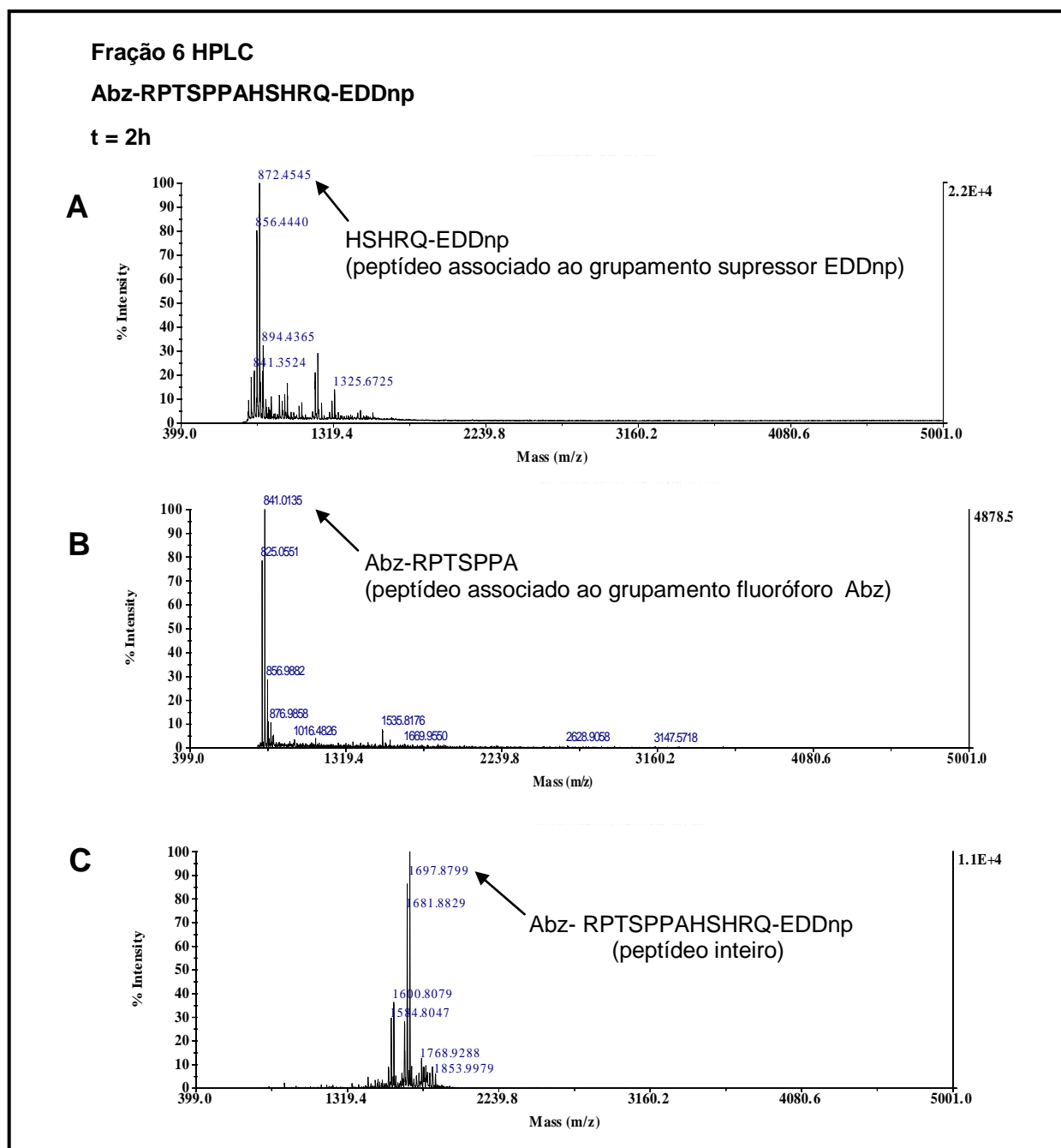


Figura 13: Análise por espectrometria de massa dos produtos do peptídeo fluorogênico incubado por 2h com a fração 6. Os picos com pesos moleculares de 872.4545, 841.0135 e 1697.8799, presentes nos gráficos, correspondem aos fragmentos HSHRQ-EDDnp e Abz-RPTSPPA e ao peptídeo inteiro Abz-RPTSPPAHSHRQ-EDDnp, nos gráficos A, B e C, respectivamente.

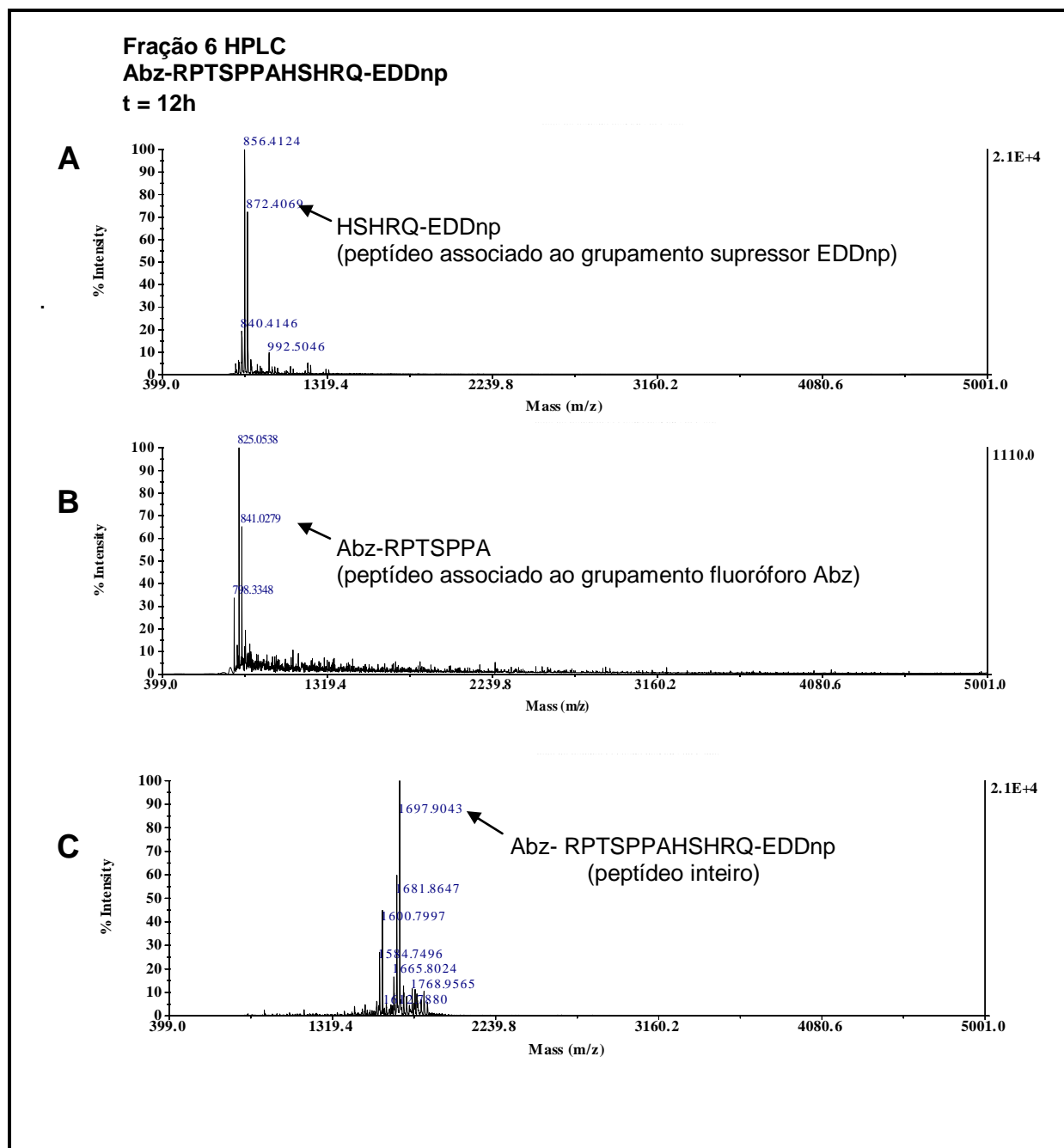


Figura 14: Análise por espectrometria de massa dos produtos do peptídeo fluorogênico incubado por 12h com a fração 6. Os picos com os pesos moleculares de 872.4069, 841.0279 e 1697.9043, presentes nos gráficos, correspondem aos fragmentos HSHRQ-EDDnp e Abz-RPTSPPA e ao peptídeo inteiro Abz-RPTSPPAHSHRQ-EDDnp, nos gráficos A, B e C, respectivamente.

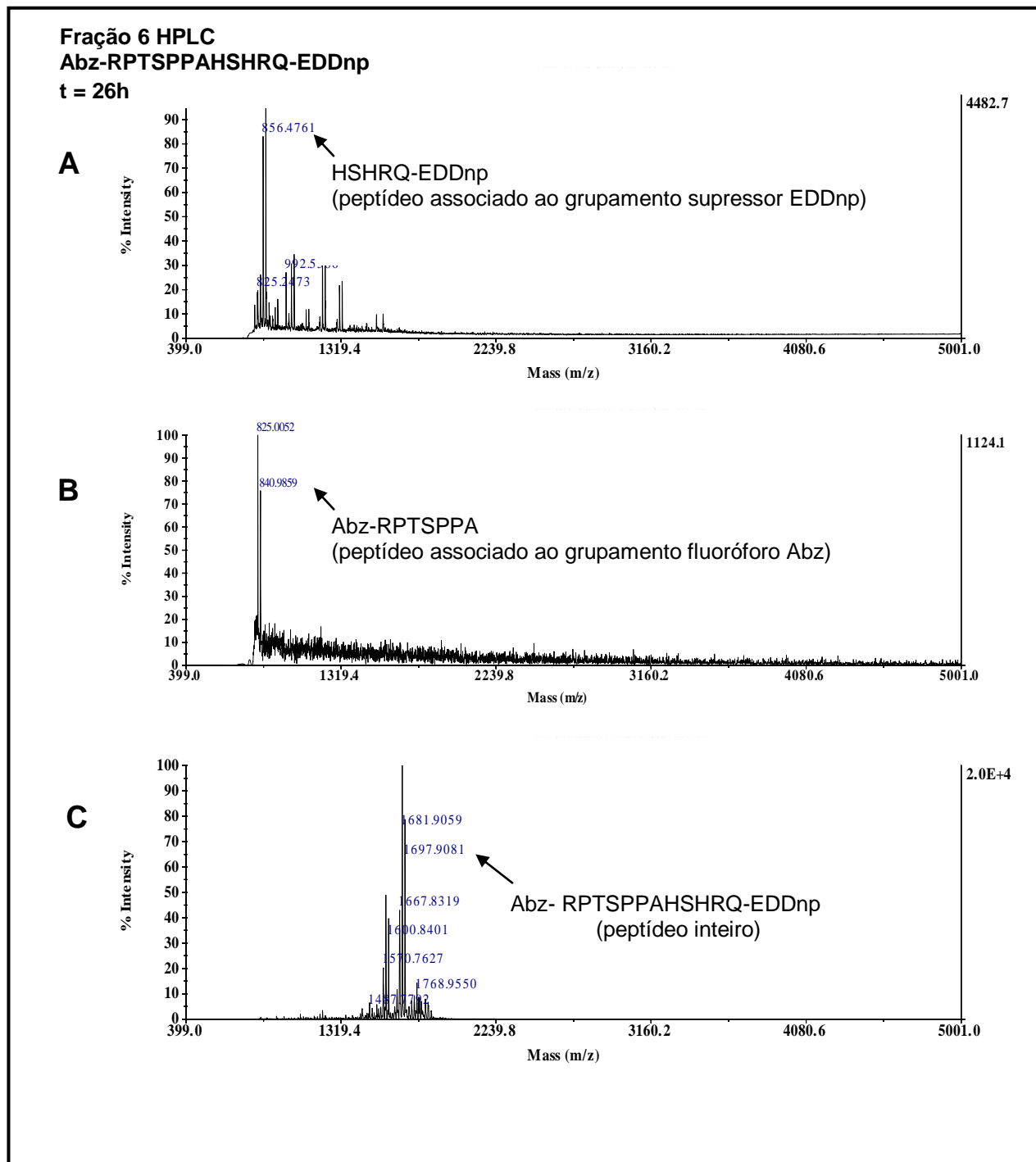


Figura 15: Análise por espectrometria de massa dos produtos do peptídeo fluorogênico incubado por 26h com a fração 6. Os picos com os pesos moleculares de 856.4761, 840.9859 e 1697.9081, presentes nos gráficos, correspondem aos fragmentos HSHRQ-EDDnp e Abz-RPTSPPA e ao peptídeo inteiro Abz-RPTSPPAHSHRQ-EDDnp, nos gráficos A, B e C, respectivamente.

Peptídeo associado a Abz	Massa molecular	Peptídeo associado a EDDnp	Massa molecular
Abz-R	293,2	PTSPPAHSHRQ-EDDnp	1422,5
Abz-RP	390,3	TSPPAHSHRQ-EDDnp	1325,4
Abz-RPT	491,4	SPPAHSHRQ-EDDnp	1224,3
Abz-RPTS	578,5	PPAHSHRQ-EDDnp	1137,2
Abz-RPTSP	675,6	PAHSHRQ-EDDnp	1040,1
Abz-RPTSPP	772,7	AHSHRQ-EDDnp	943
Abz-RPTSPPA	843,8	HSHRQ-EDDnp	871,9
Abz-RPTSPPAH	981	SHRQ-EDDnp	734,8
Abz-RPTSPPAHS	1068	HRQ-EDDnp	647,7
Abz-RPTSPPAHSH	1205,2	RQ-EDDnp	510,5
Abz-RPTSPPAHSHR	1361,4	Q-EDDnp	354,3
Peptídeo inteiro: Abz-RPTSPPAHSHRQ-EDDnp, PM = 1697,7.			

Tabela 3. Possíveis pesos moleculares de peptídeos gerados por proteólises crescentes, aminoácido-a-aminoácido, do peptídeo fluorogênico. Nesta tabela podemos constatar que as massas moleculares presentes nos gráficos das figuras 13-15 giram em torno daquelas referentes aos fragmentos, em negrito, Abz-RPTSPPA e HSHRQ-EDDnp, produzidos pela proteólise no ponto de clivagem correspondente à geração da endostatina, entre a histidina (H) e a alanina (A). Variações nas massas moleculares são decorrentes de possíveis protonações ou desprotonações dos fragmentos. Na parte de baixo da tabela acrescentamos a seqüência do peptídeo inteiro, com sua massa correspondente.

4.2. Inibição da atividade proteolítica

A hidrólise do peptídeo humano pelas células EOMA foi medida na presença de diferentes inibidores de proteases (Figura 12B). Adição de orto-fenantroline e/ ou fosforamidon, ambos inibidores de metalo-proteases, não diminuiu a atividade controle. Tendo em vista que EDTA leva as células a se destacarem, não foi testado como um inibidor de metalo-protease neste experimento (protocolo A). O inibidor de serino e cisteíno-proteases, leupeptina, isolado ou em combinação com E64, o qual é específico para cisteíno-proteases, não se mostrou eficiente. Outras drogas como PMSF (um inibidor geral de serino-proteases), elastatinal (inibidor de elastase), enalaprilato (inibidor seletivo da enzima conversora de angiotensina) e pepstatina A (inibidor de aspartil-proteases) foram testados e não promoveram inibição do processamento do peptídeo (dado não mostrado). A descrição de uma protease de células mioepiteliais não sensível a inibidores gerais de serino-proteases, mas susceptível a inibidores seletivos de quimotripsina, instigou-nos a testá-los em nossos experimentos (Lee *et al.*, 2000). Surpreendentemente, a adição de TPCK e/ ou quimostatina, promoveu a inibição de aproximadamente 50% da atividade da enzima (Figura 12B). Sabe-se que quimotripsina cliva ligações peptídicas pelo C-terminal de resíduos aromáticos, tirosina, triptofano e fenilalanina. Embora nenhum desses aminoácidos esteja presente em nossos peptídeos, tem sido mostrado que quimotripsina pode reconhecer resíduos de alanina e leucina (A.Barret, Handbook of Proteolytic Enzymes). A incubação dos peptídeos com quimotripsina comercial não resultou em hidrólise detectável (não mostrado). Pudemos ainda observar que outros dois inibidores de serino-proteases, benzamidina e AEBSF, inibiram a protease quando empregados em concentração milimolar. Dessa forma, concluímos que a enzima investigada aqui é uma serino-protease, que apresenta uma sensibilidade peculiar a inibidores de proteases.

4.3. Localização da protease

Pudemos observar que quando o meio de cultura foi trocado pelo tampão Tris-HCl contendo NaCl 150 mM e sem CaCl₂, as células EOMA (Figura 16) se arredondaram e puderam ser destacadas do fundo da garrafa através de pipetagem suave, sem a necessidade do emprego de tripsina. O peptídeo fluorogênico foi adicionado diretamente a uma cubeta de fluorescência contendo as células em suspensão (protocolo B). O aumento da fluorescência, a qual é paralela à atividade proteolítica, foi acompanhada por 2 horas (Figura 17). A hidrólise pelas células em suspensão foi 4 vezes maior que a observada pelas células aderidas, fato este que pôde sugerir estar a protease ligada à membrana plasmática baso-lateral e, dessa forma, pouco acessível pelo lado em contato com o substrato de cultura. Para testar se a protease estava ligada à membrana plasmática, células EOMA foram sedimentadas por centrifugação e medidas as atividades no pellet e no sobrenadante. Surpreendentemente, toda a atividade estava no sobrenadante (Figura 17), o que sugere que a enzima tenha sido liberada da superfície de EOMA. Para investigar a possibilidade de haver “*shedding*” constitutivo da enzima para a fase líquida da cultura, um meio condicionado foi preparado pela incubação de células EOMA com tampão por 2 horas. Após este período de tempo, o tampão foi cuidadosamente coletado, para evitar contaminação com células pobremente aderidas, e transferido para a uma cubeta, à qual o peptídeo foi adicionado. Como mostrado na Figura 17, não houve qualquer hidrólise do peptídeo fluorogênico pelo tampão condicionado, o que indica que a liberação da protease para o sobrenadante não foi constitutiva, mas, ao invés disto, resultou da manipulação das culturas.

Consideramos a possibilidade de que a protease sob investigação pudesse ser intracelular, citoplasmática ou lisossomal, e liberada por possível rompimento da membrana celular associado à manipulação. Esta hipótese foi excluída, baseando-nos em 3 controles experimentais, realizados no período de mestrado e confirmados na fase de doutorado. Primeiramente, medimos a proteólise em

diferentes pHs e verificamos que o pico de atividade localizava-se no pH 7 (Figura 18). Sabendo que catepsinas lisossomais típicas apresentam um pH ótimo na faixa ácida, concluímos que a protease provavelmente não se localizava em lisossomas. A seguir, uma correlação entre o aumento da ruptura celular e o aumento da atividade proteolítica foi investigada. Através deste experimento, induzimos o rompimento das membranas plasmáticas por aumentos progressivos na velocidade de centrifugação celular. Após centrifugação, cada amostra foi analisada tanto pela contagem do número de células permeáveis ao azul de tripan quanto pela mensuração da atividade proteolítica. O resultado obtido demonstra que embora a centrifugação promova um progressivo aumento na porcentagem de células rompidas (acima de 2% a 3200 rpms; ver *inset* da Figura 19), a atividade da protease nos sobrenadantes resultantes não foi, concomitantemente, aumentada (Figura 19). O aumento do número de células mortas foi inversamente proporcional ao ganho de atividade pelos sobrenadantes correspondentes a cada amostra celular (Figura 19). Finalmente, adicionamos Triton X-100 0.2% a células em suspensão para forçar a liberação de proteases intracelulares. Nesta condição, nenhum aumento na atividade com o emprego do peptídeo foi observado. Baseados nestes resultados, propomos que a protease descrita neste trabalho encontre-se fracamente associada à membrana plasmática e seja liberada, sem significativa morte celular, pela manipulação. Tal resultado é compatível com o obtido por Pizarro e colaboradores (2004) que descreve a presença de proteassoma extracelular em espermatozóide humano.

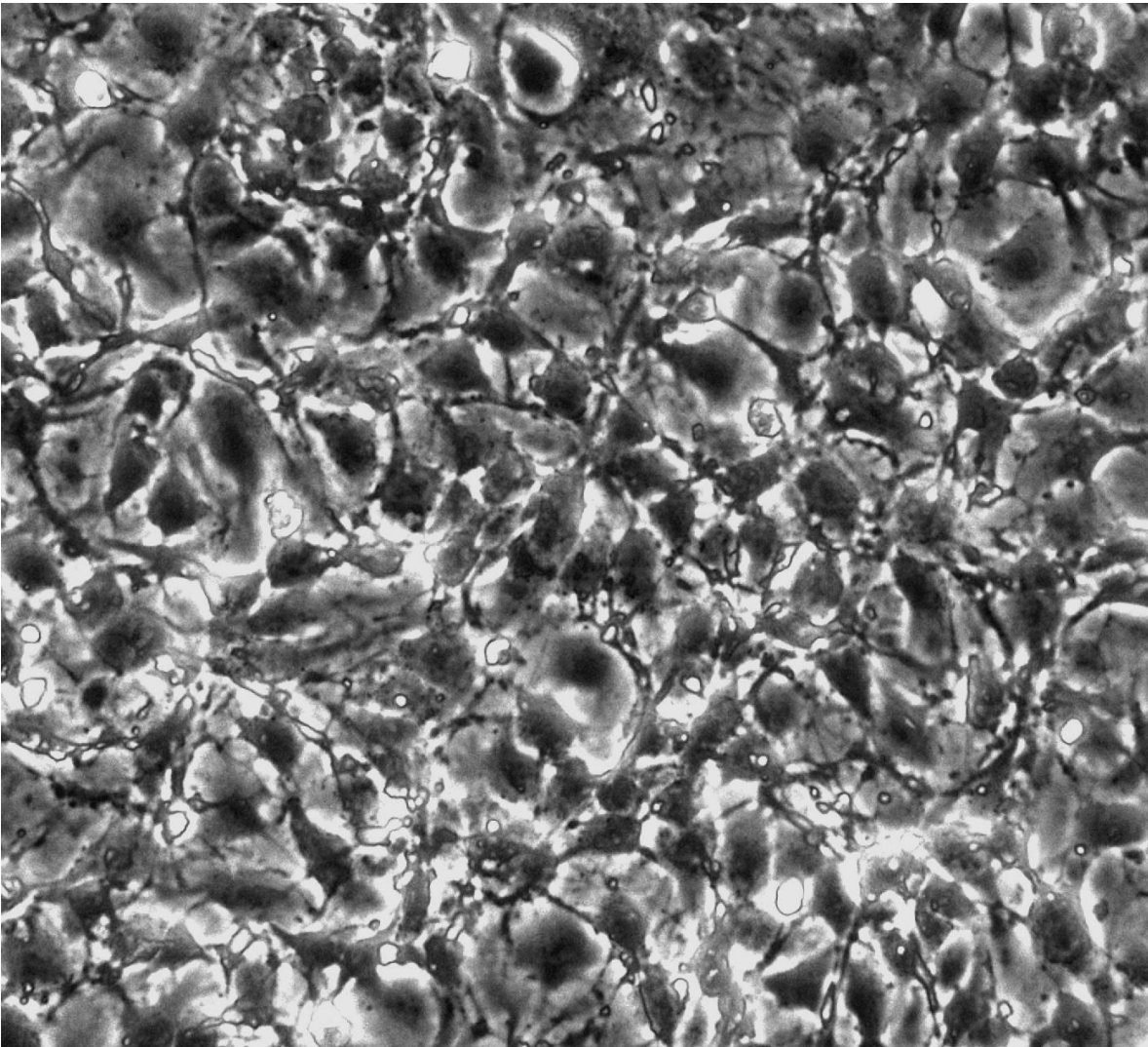


Figura 16: Microscopia óptica de contraste de fase de cultura de células EOMA. Imagem de cultura de células EOMA em confluência visualizada com uma objetiva de 40 vezes e capturada por câmera Leica DC300 acoplada a um microscópio óptico de contraste de fase.

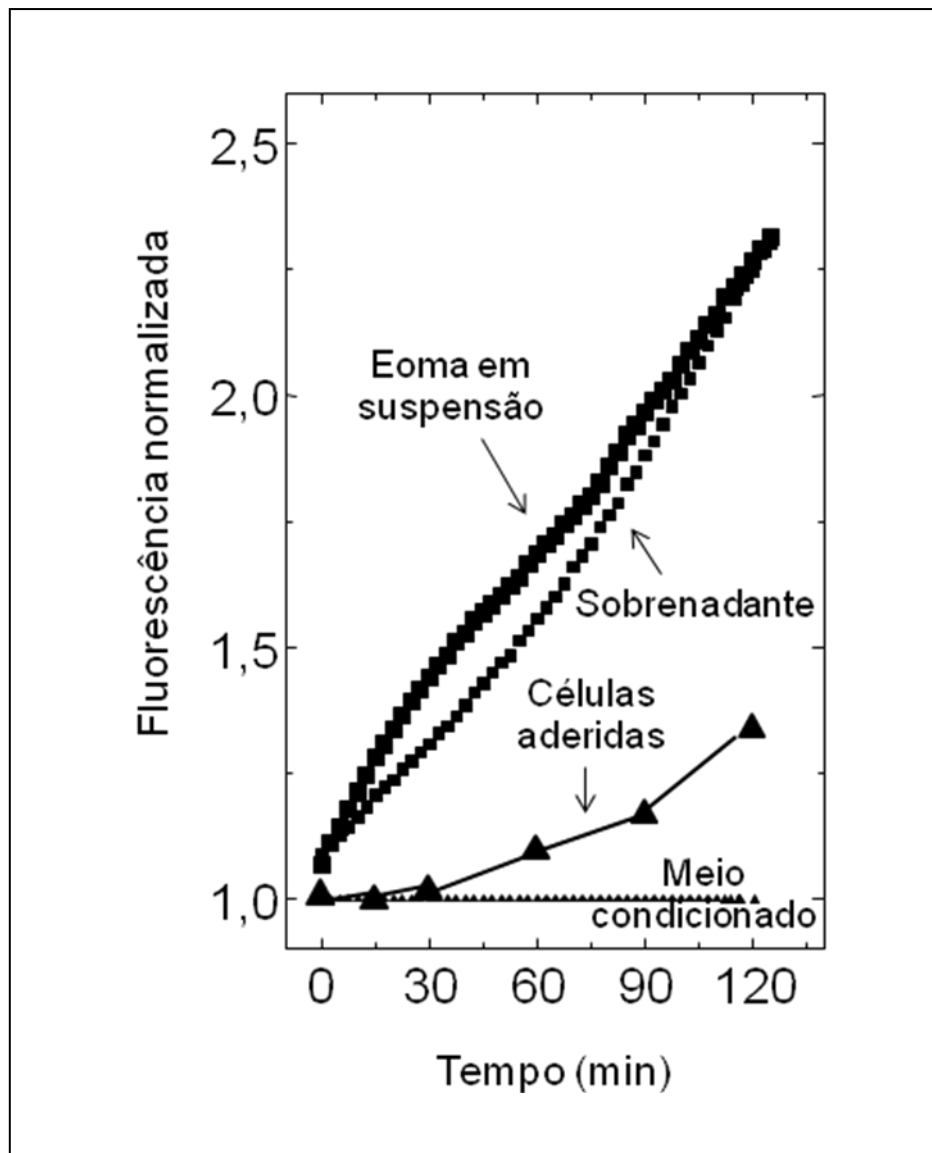


Figura 17: Atividade proteolítica de diferentes frações das células EOMA. A atividade proteolítica sobre o peptídeo humano foi medida por 2 horas em diferentes frações de EOMA conforme indicado na figura. O resultado apresentado é representativo de um conjunto de 5 experimentos.

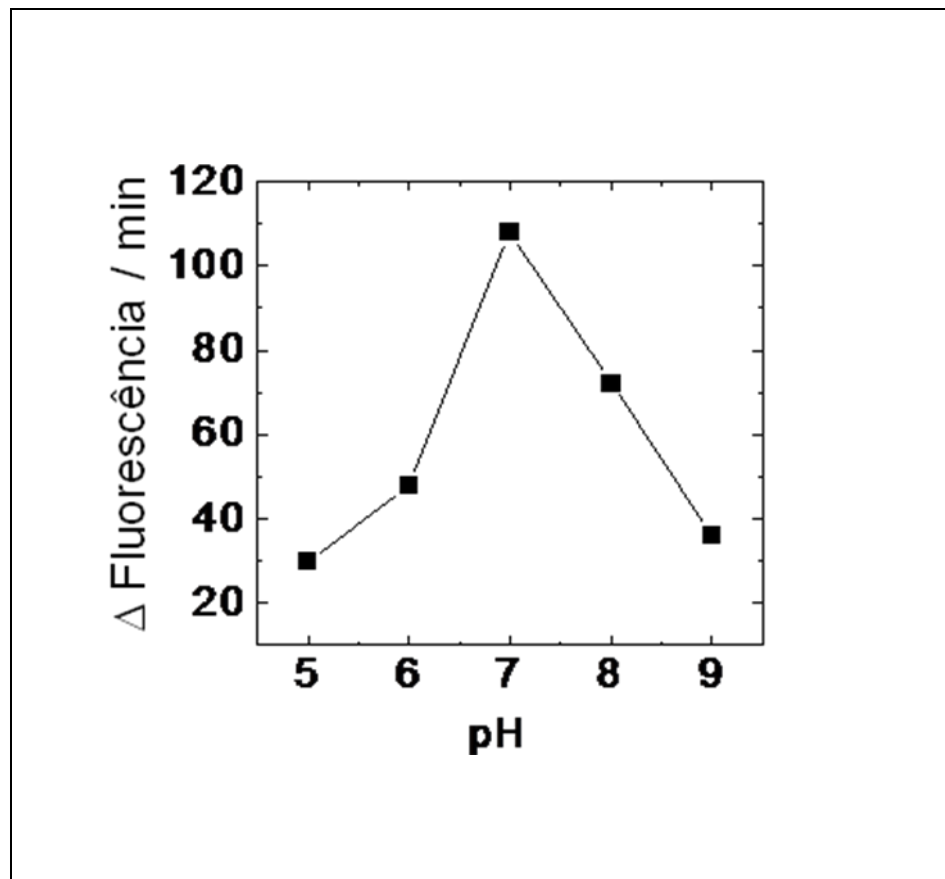


Figura 18: Análise da atividade proteolítica do sobrenadante de células EOMA em diferentes pHs. A atividade da protease de EOMA foi testada sobre o peptídeo humano nos pHs indicados na abscissa. O resultado apresentado é representativo de um conjunto de 4 experimentos.

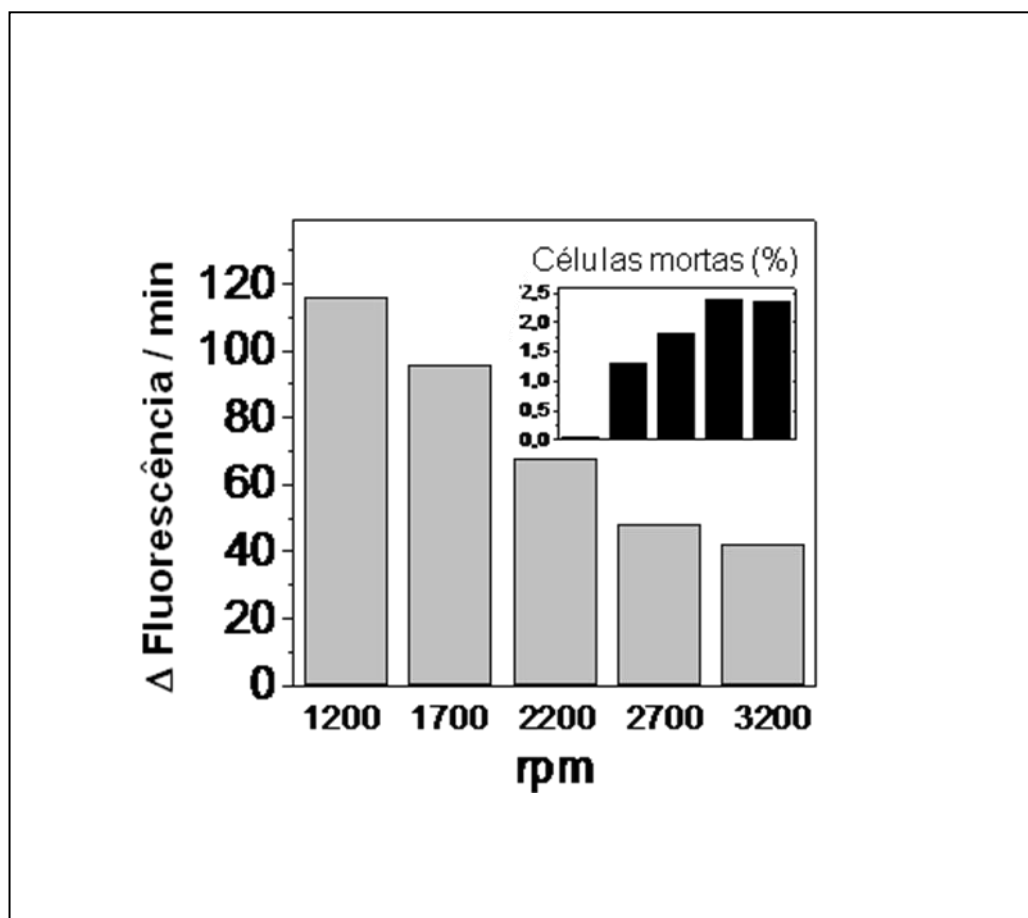


Figura 19: Análise da atividade proteolítica do sobrenadante de células EOMA submetidas a diferentes velocidades de centrifugação. A comparação entre os dois gráficos, o principal e o do *inset*, demonstram a relação inversamente proporcional entre a atividade presente no sobrenadante das células EOMA centrifugadas em velocidades de rotação progressivamente mais altas e o número de células mortas em cada situação. O resultado apresentado é representativo de um conjunto de 3 experimentos.

4.4. Purificação da protease

Os sobrenadantes de EOMA foram concentrados 10 vezes com o emprego do dispositivo centricon em filtrações sucessivas com o aumento progressivo dos poros das membranas de filtração e em seguida submetidos à mensuração da atividade proteolítica sobre o peptídeo. Surpreendentemente, quando testamos YM 100, o qual apresenta uma membrana de filtração de 100 kDa, a atividade ainda permanecia na fração retida, indicando que a enzima apresentava peso molecular acima de 100 kDa (Figura 20). Tal resultado foi obtido na fase de mestrado e confirmado no período de doutorado. A fração retida de centricon YM100 e concentrada mais 10 vezes em speedvac foi aplicada a uma coluna de gel filtração para FPLC, Superose 6HR. O perfil de eluição da proteína e as atividades recuperadas em cada fração são apresentados na Figura 21. O principal pico da proteína foi em torno de 47 minutos, no entanto, a análise deste pico pelo espectrômetro de massa revelou que se tratava de albumina de origem bovina, cuja presença no sobrenadante pode ser explicada como um contaminante do SFB adicionado a culturas. O pico principal de atividade da protease foi detectado na fração 6, o qual corresponde ao peso molecular maior que 669 kDa (tiroglobulina, seta à esquerda). Uma massa molecular tão grande sugere que a protease apresente uma estrutura multimérica. Três outros picos foram detectados no diagrama de atividade Um majoritário correspondente à fração 11 e dois outros mais reduzidos nas frações 16 e 18. O primeiro tinha uma correlação no registro de absorvância correspondente a aproximadamente a 669 kDa. As frações 16 e 18, correspondentes aos pesos moleculares de aproximadamente 47 kDa e 20 kDa, poderiam corresponder ao dímero e ao monômero da protease.

De modo a descartar a possibilidade de que a entidade de alto peso molecular encontrada aqui pudesse resultar de um artefato de concentração protéica gerando agregação, aplicamos sobrenadantes de EOMA concentrada ou não pelo centricon YM100 na coluna de FPLC e encontramos picos de proteínas idênticos das frações 6, 10, 16 e 18, em todos os casos. Em resumo, nossos

resultados indicam que a protease que apresenta atividade sobre os peptídeos fluorogênicos é um complexo multimérico.

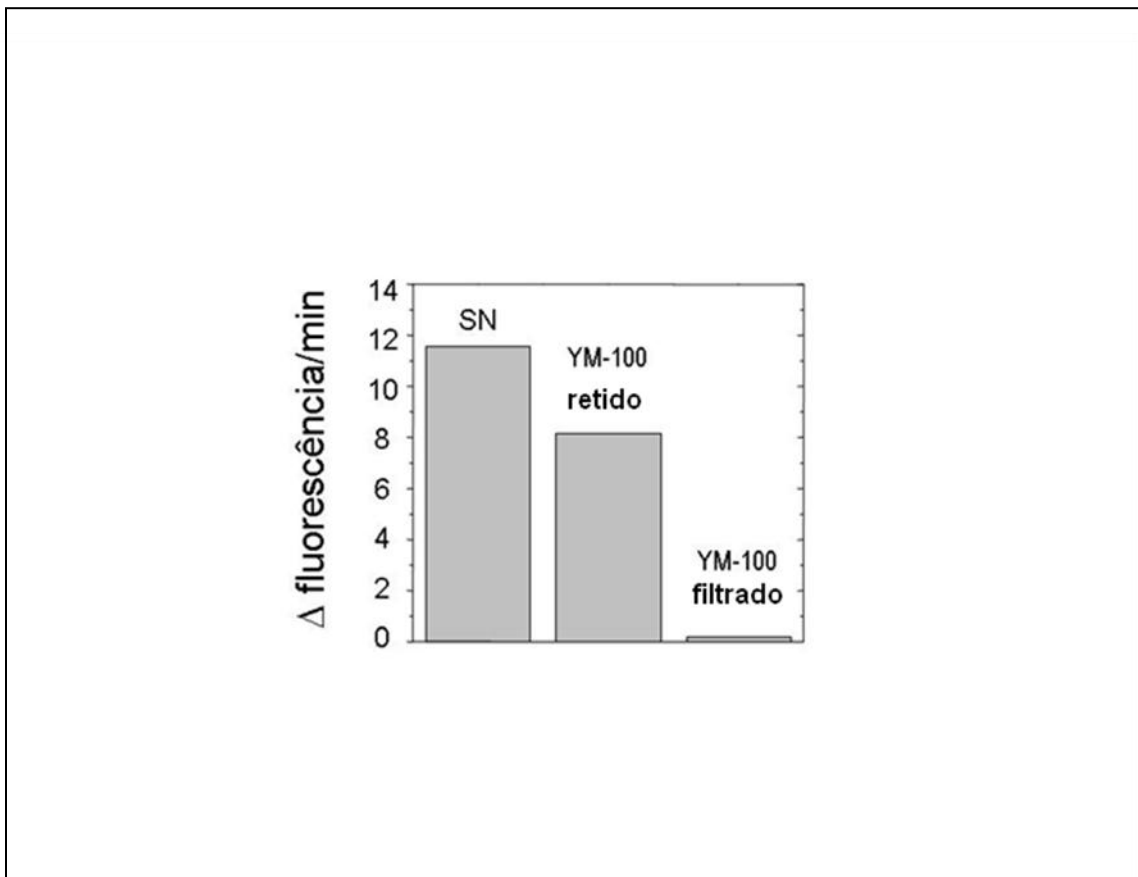


Figura 20: Comparação entre as atividades encontradas no sobrenadante de EOMA após filtração no dispositivo YM-100. Neste gráfico de barras podemos observar que a atividade do sobrenadante de EOMA está concentrada na fração retida em centricon YM100 e ausente na fração filtrada, o que indica que o peso molecular da protease pesquisada deve ser maior que 100 kDa. Legenda: SN = sobrenadante; YM100 retido = fração retida em centricon YM100 e YM100 filtrado = fração filtrada em centricon YM100. O resultado apresentado é representativo de um conjunto de 10 experimentos.

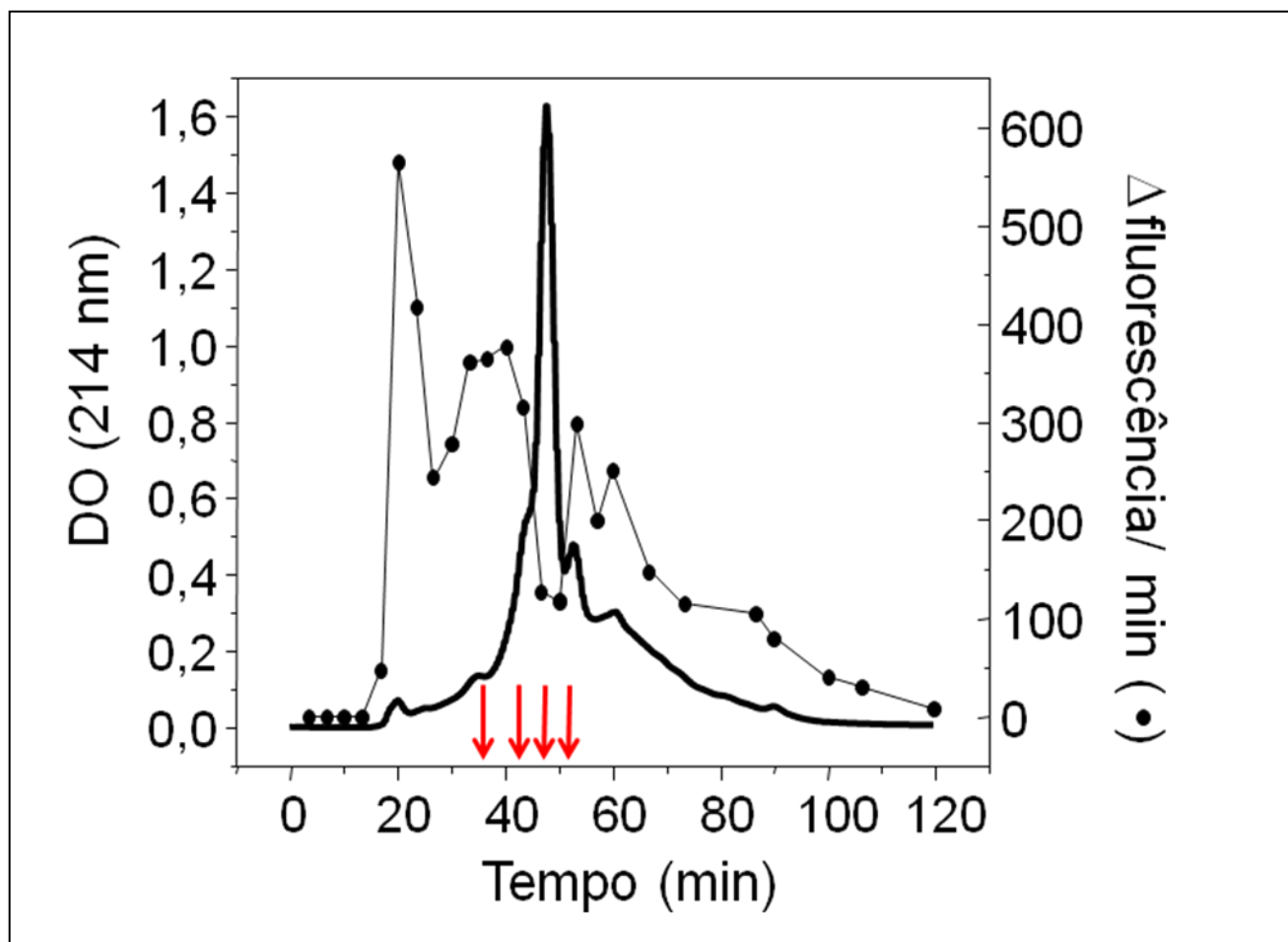


Figura 21: Perfil de eluição do sobrenadante de EOMA em coluna de gel filtração. Este gráfico correlaciona a absorbância das frações eluídas de uma coluna superose 6HR com a atividade proteolítica sobre o peptídeo humano medida para cada fração. Podemos observar que as maiores atividades correspondem às frações eluídas aos 20 min e aos 35 min, correspondentes às frações 6 e 11. Atividades menores estão presentes nas frações 16 e 18. As setas indicam as posições de saída de 4 padrões, da esquerda para a direita: tiroglobulina, 669 kDa; apoferritina, 440 kDa; albumina, 67 kDa e ovalbumina, 47 kDa. Linha cheia = absorbância (214 nm) e linha clara = Δ fluorescência/min. O resultado apresentado é representativo de um conjunto de 3 experimentos.

4.5. Caracterização da protease purificada

A atividade da protease purificada foi testada sobre o peptídeo humano e um aumento de 3 vezes em sua atividade foi observada quando comparada à atividade encontrada no sobrenadante de EOMA (Figura 22). A adição de TPCK ou quimostatina em concentrações saturantes de 50 e de 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, promoveram aproximadamente 70% de inibição da atividade (Figura 22). O inibidor geral de serino-proteases AEBSF a uma concentração de 1 mM reduziu a atividade em 30% enquanto uma concentração 10 vezes maior aumentou a inibição para 85 % (Figura 22). O inibidor de proteassoma e de proteases lisossomais, MG132 a 1 μM , inibiu em 50% a atividade da fração 6, enquanto a concentração de 10 μM , em aproximadamente 90% (Figura 22).

A protease corresponde a um grande complexo proteico visualizado, na fase de mestrado, por microscopia eletrônica através da técnica de contrastação negativa. A análise do complexo, que apresenta o formato de um cilindro, com uma secção transversal em anel, permitiu deduzirmos tratar-se, devido à similaridade estrutural, a um proteassoma 20S (Figura 23). A imagem do proteassoma é semelhante a descrita por Fonseca e Morris (2008).

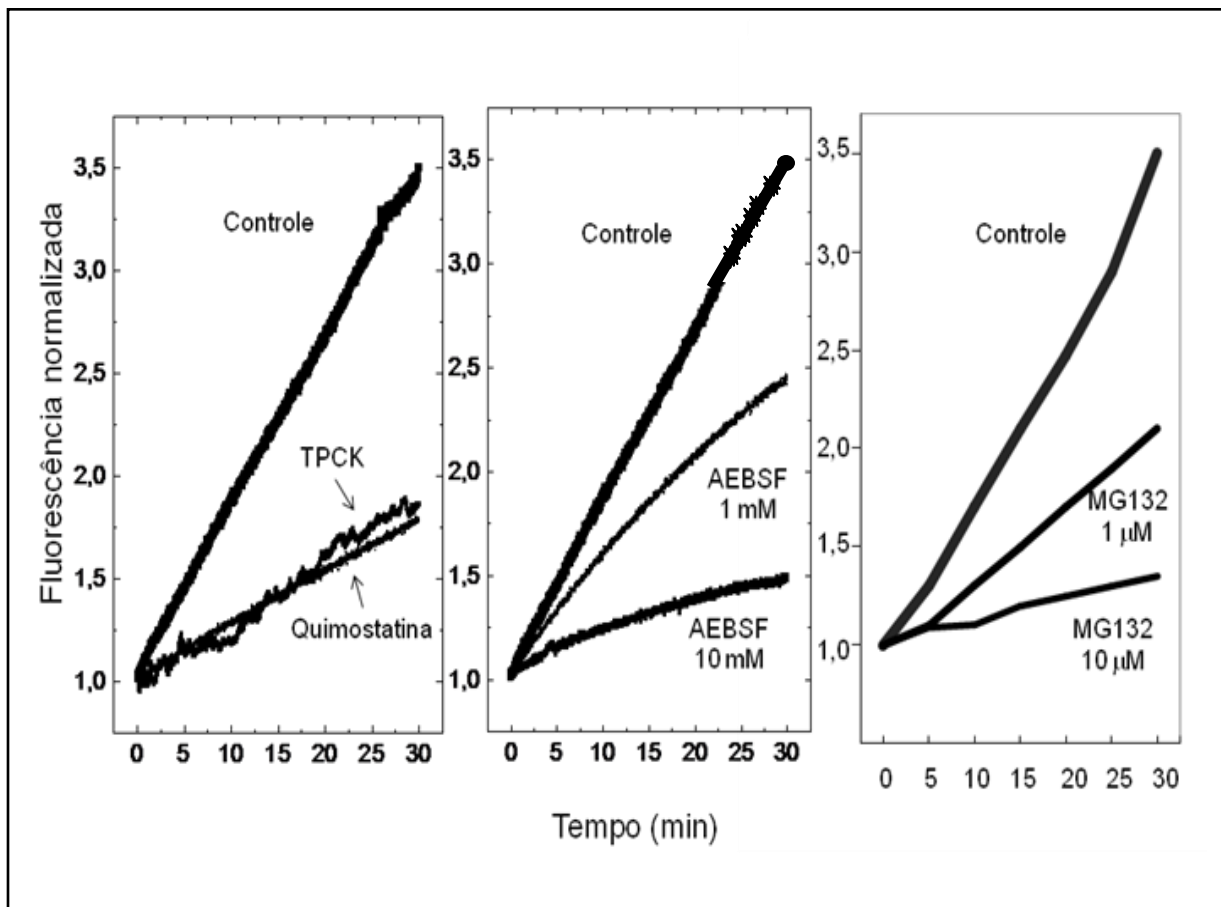


Figura 22: Inibição da atividade proteolítica da fração 6 Os gráficos da esquerda para a direita correspondem a inibição da fração 6 de EOMA pelos seguintes inibidores: 1) TPCK e quimostatina, inibidores de serino-proteases tipo-quimotripina; 2) AEBSF, inibidor geral de serino-protease; e 3) MG132, inibidor de proteassoma e de proteases lisossomais. O resultado apresentado é representativo de um conjunto de 5 experimentos.

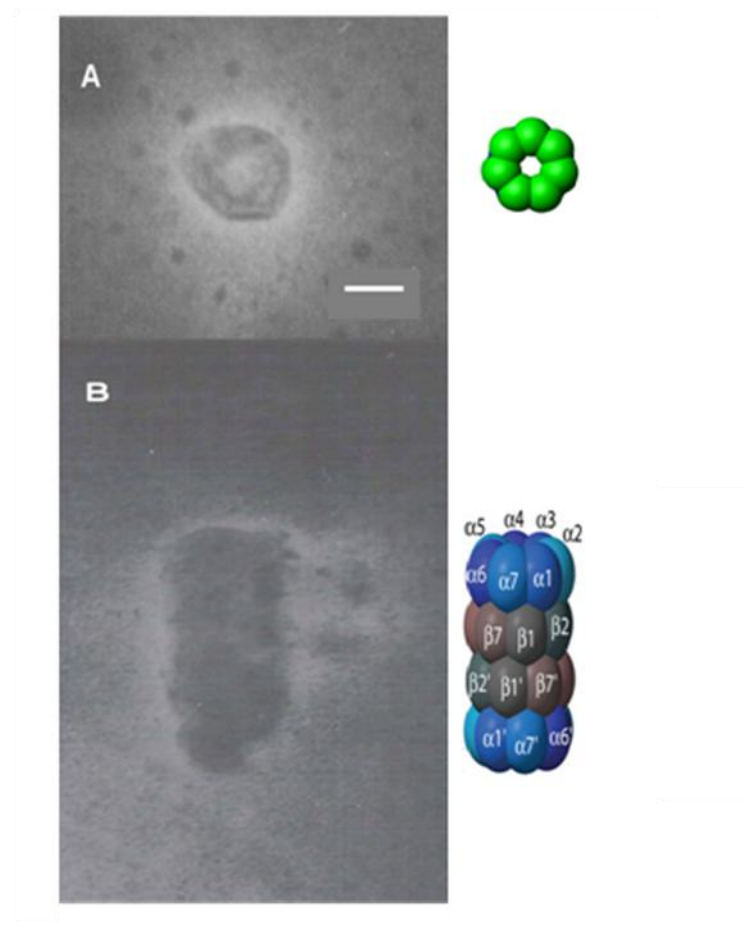


Figura 23: Fotomicrografias das partículas presentes na fração 6 de EOMA. Estas imagens foram obtidas pela técnica de contrastação negativa em microscopia eletrônica de transmissão e são compatíveis com a vista superior (A) e lateral (B) de um proteassoma. A barra presente na figura A corresponde a 9 nm.

4.6. Teste da atividade da protease empregando o NC1 humano como substrato

Até este momento, a purificação e caracterização da protease haviam sido realizadas pela análise da atividade enzimática sobre os peptídeos humanos sintéticos. Restava ainda, ser determinado se a enzima por nós isolada seria capaz de reconhecer a estrutura terciária do colágeno XVIII. Para resolver essa questão, testamos a atividade da protease purificada (fração 6) sobre o NC1 recombinante humano, que corresponde à porção C-terminal não colagenosa inteira do colágeno XVIII. Esta proteína foi clonada e expressa com um epítipo c-myc contíguo ao C-terminal para facilitar sua detecção (Figura 11). A proteína marcada com c-myc foi incubada com a protease em tampão Tris-HCl por 2 horas. *Western blot*, usando anti-myc, demonstrou que o rhNC1 foi clivado pela protease originando 3 fragmentos dos quais o mais baixo apresentou peso molecular correspondente ao da endostatina (Figura 24). É importante mencionar que essas duas bandas intermediárias entre o NC1 não hidrolizado e a endostatina foram igualmente gerados pela elastase e pela catepsina L, como descrito por Wen e colaboradores (1999) e Felbor e colaboradores (2000), respectivamente. A adição de AEBSF e de TPCK e quimostatina inibiram a degradação do NC1. Esse resultado demonstra que embora identificada usando um peptídeo sintético, a protease purificada era capaz de reconhecer a região do sítio de clivagem na presença da estrutura terciária do substrato.



Protease	-	+	+	+
TPCK/quimostatina	-	-	+	-
AEBSF	-	-	-	+

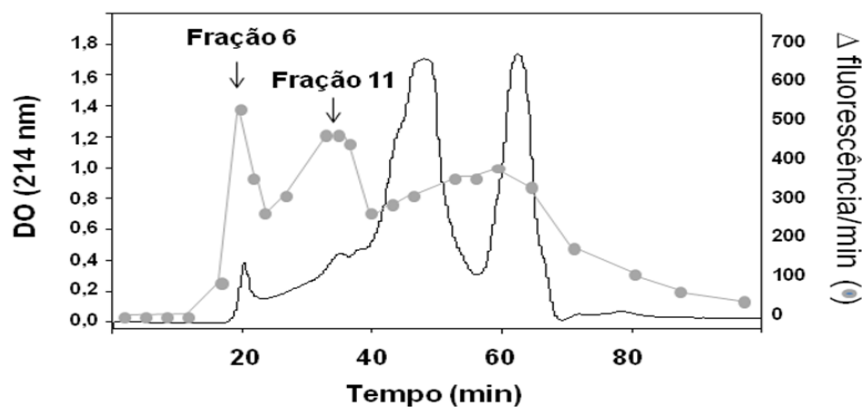
Figura 24: Geração da endostatina a partir de NC1 humano. *Western blot* do produto de incubação da fração 6 de EOMA com NC1, na presença ou não de inibidores. A banda superior corresponde ao NC1 e a de menor peso corresponde ao peso molecular da endostatina acrescida do c-myc. Duas outras bandas intermediárias de pesos moleculares maiores que o da endostatina puderam ser produzidas pela protease da fração 6 de EOMA. SDS-PAGE 12% foi empregado para este experimento.

4.7. Purificação da protease de astrocitoma humano

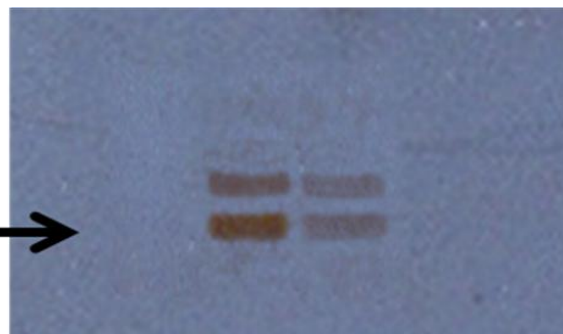
Até o momento nesta tese empregamos o peptídeo sintético mimetizando o sítio de clivagem do Col XVIII humano para isolar a protease responsável pela liberação da ES de um substrato humano. Contudo, a enzima por nós purificada foi isolada de culturas em culturas de células EOMA, uma linhagem murina. Logo, para confirmar se a protease identificada em nossos estudos era capaz de produzir endostatina humana, fez-se necessário demonstrar que células humanas também produziam a enzima. Dessa forma, processamos o sobrenadante de células de astrocitoma de modo a isolar a enzima de origem humana. As células de astrocitoma foram coletadas com tampão Tris-HCl 10 mM com NaCl 150 mM e EDTA 0,5 mM. A atividade hidrolítica sobre o peptídeo sintético foi detectada no sobrenadante, sugerindo que uma protease similar à presente em células EOMA pudesse estar sendo liberada da membrana celular. Quando o tampão condicionado foi carregado na coluna Superose 6HR, o pico principal de atividade foi também eluído na fração 6 (Figura 25A). A fração 6 foi incubada com HUVEC que produz o Col XVIII (humano) mas não uma enzima endógena capaz de quebrar a molécula parental (Figura 25B). Dessa forma, quando as células foram incubadas com o veículo somente, tampão Tris 10 mM com NaCl 150 mM, não houve produção de endostatina. Por outro lado, quando a protease purificada de astrocitoma foi incubada com HUVEC por 2 horas, endostatina foi produzida, como verificado pela visualização de uma banda de 20 kDa no *western blot* revelado com anticorpo anti-endostatina. A geração de endostatina foi inibida pelo AEBSF. Esses resultados confirmam que a enzima identificada aqui produz endostatina a partir do Col XVIII no sistema humano.

A

SOBRENADANTE DE ASTROCITOMA

**B**

ENDOSTATINA
(20 kDa)



Protease de Astrocitoma	-	+	+
Meio condicionado de HUVEC	+	+	+
AEBSF	-	-	+

Figura 25: A protease da fração 6 de astrocitoma humano pode gerar endostatina a partir do Col XVIII humano. No gráfico, em A, podemos observar a presença de picos de eluição semelhantes aos de EOMA que eluíam aos 20 min, 35 min e 60 min. Na imagem do *western blot*, em B, podemos verificar que a fração 6 quando incubada por 2 h com as células HUVEC era capaz de gerar endostatina, sendo inibida por AEBSF. A endostatina não estava presente no meio condicionado das células HUVEC, mas pôde ser observada nas amostras correspondentes ao incubado de células HUVEC com a fração 6 e quando empregado AEBSF, um inibidor geral de serino-proteases, associado a fração 6.

4.8. Seqüenciamento da subunidade $\alpha 2$ de proteassoma

O fato de termos conseguido demonstrar que a protease por nós identificada, tanto em EOMA quanto em astrocitoma humano, era capaz de gerar endostatina em substratos naturais, nos encorajou a retomar as tentativas de identificá-la inequivocamente por espectrometria de massa. Para tanto, partimos de uma quantidade bastante maior de células (ver Materiais e Métodos) e optamos por escolher bandas específicas para o seqüenciamento, mesmo em um conjunto maior de bandas. Uma vez que sabíamos que nossa protease apresentava uma morfologia semelhante à de um proteassoma e que era inibida pelo inibidor de proteassoma MG132, optamos por procurar especificamente bandas que pudessem identificar componentes do proteassoma 20S. Assim, foram confeccionados géis a partir do sobrenadante concentrado em centricon YM100 e as bandas correspondentes aos pesos moleculares entre 36 kDa e 19 kDa foram cortadas e seqüenciadas. Em meio às proteínas seqüenciadas de camundongo, foram encontradas esterase D/ hidrolase formilglutaciona, isoforma *epsilon* da proteína 14-3-3, glutaciona S-transferase *omega* 1, proteína *heat shock* 1, glutaciona S-transferase PI 1, peroxirredoxina 1, proteína ribossomal S9 e L26 e quinase difosfatase de nucleosídeo, pudemos identificar a subunidade $\alpha 2$ de proteassoma a partir de 12 peptídeos identificados e 3 seqüenciados (HIGLVYSGMGPDYR, LAQQYYLVYQEPIPTAQLVQR, LTPTEVRDYLAIA), totalizando 44% de cobertura. Quando o mesmo gel foi submetido à técnica de *western blot*, pudemos observar que a banda referente à subunidade $\alpha 2$ de proteassoma correspondia em altura a uma das duas bandas majoritárias produzidas por esta técnica (Figura 26). As mesmas bandas estavam igualmente presentes em *western blot* pareado a gel desnaturante (SDS-PAGE) 12% da fração 6 de EOMA (Figura 27).

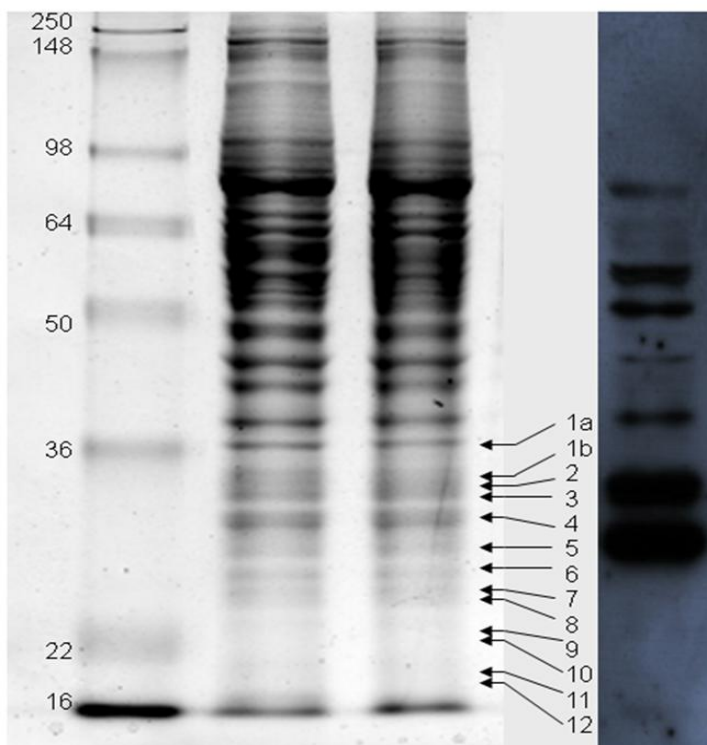


Figura 26: Subunidade de proteassoma em gel seqüenciado e pareado com *western blot*. Nas duas colunas ao centro, visualizamos bandas coradas pela técnica de *coomassie blue* coloidal, presentes em SDS-PAGE 12% de amostras de sobrenadante de EOMA concentrado em centricon YM100. As bandas que apresentavam pesos moleculares entre 19 kDa e 36 kDa correspondiam, após cortadas e seqüenciadas, às seguintes proteínas: 1a) esterase D, 1b) hidrolase formilglutaciona, 2) isoforma *epsilon* da proteína 14-3-3, 3) glutaciona S-transferase *omega* 1, 4) proteína *heat shock* 1, 5) subunidade $\alpha 2$ de proteassoma, 6) glutaciona S-transferase PI 1, 7) peroxirredoxina 1, 8) proteína ribossomal S9, 9 e 10) não identificadas, 11) proteína ribossomal L26 e 12) quinase difosfatase de nucleosídeo. A banda 5 seqüenciada corresponde a uma banda evidenciada pela técnica de *western blot* por anticorpo anti-subunidades de proteassoma, presente na coluna à direita. Na coluna à esquerda podemos visualizar às proteínas do padrão de peso molecular empregado neste experimento.

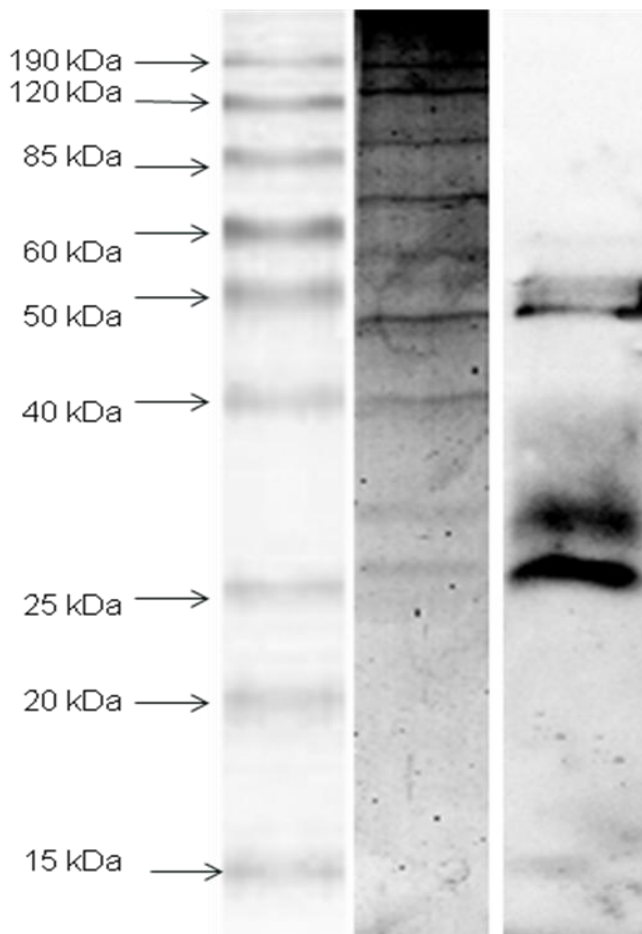


Figura 27: Subunidades de proteassoma em fração 6 de EOMA. Bandas majoritárias que correspondiam aos pesos moleculares entre 27 e 30 kDa puderam ser evidenciadas por *western blot* pareado a SDS-PAGE 12% de fração 6 de EOMA. As faixas acima correspondem da esquerda para a direita a: 1) padrão de peso pré-corado, 2) gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% corado por prata e 3) *western blot* pareado com o gel da faixa 2.

4.9. Gel de atividade pareado com *western blot* anti-subunidades de proteassoma

Amostra de sobrenadante de EOMA concentrado em centricon YM100 foi injetada em gel de poliacrilamida não desnaturante 6%. Após a corrida, tal gel foi dividido em 3 partes, as quais receberam diferentes tratamentos. A faixa 1 foi incubada com o peptídeo fluorogênico como descrito em Materiais e Métodos, a faixa 2 foi corada com coomassie blue coloidal e a faixa 3 transferida para membrana de nitrocelulose e submetida à técnica de *western blot* com emprego de anticorpo anti-subunidades de proteassoma. Através deste experimento, pudemos visualizar o aparecimento de uma banda laranja gerada em gel de atividade na faixa 1, após incubação com peptídeo fluorogênico. Esta banda correspondia a uma banda presente na faixa 2 que foi corada com *coomassie blue* coloidal. Tal banda foi reconhecida pelo anticorpo anti-subunidades de proteassoma, na faixa 3 (Figura 28). Num outro experimento em que o sobrenadante concentrado em centricon YM 100 foi injetado em gel nativo 6%, pudemos acompanhar a seqüência temporal do surgimento de uma banda de atividade a partir de 10 min em contato com o peptídeo fluorogênico, cuja intensidade de fluorescência era máxima aos 20 min, decaindo a partir desse momento (Figura 29).

Banda do proteassoma 20S com atividade

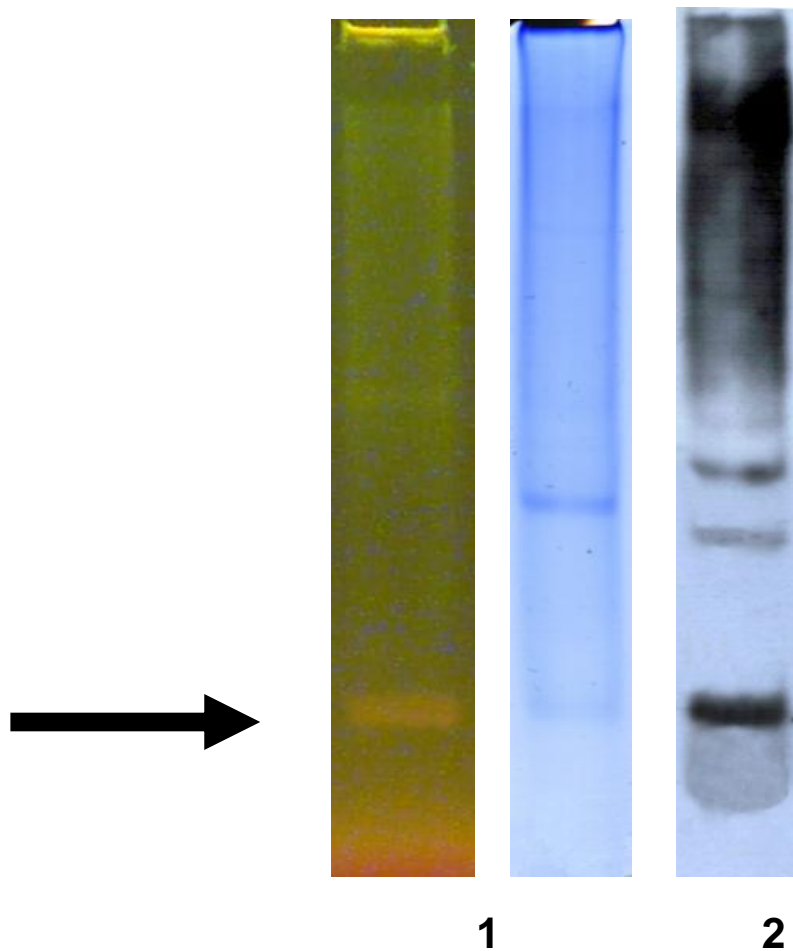


Figura 28: Géis nativos pareados com *western blot*. Bandas de mesma altura presentes em géis nativos e *western blot*. Da esquerda para direita, as seqüências de imagens correspondem a: 1) gel de atividade, 2) gel nativo corado por *coomassie blue* e 3) gel submetido à técnica de *western blot* com emprego de anticorpo anti-subunidades de proteassoma.

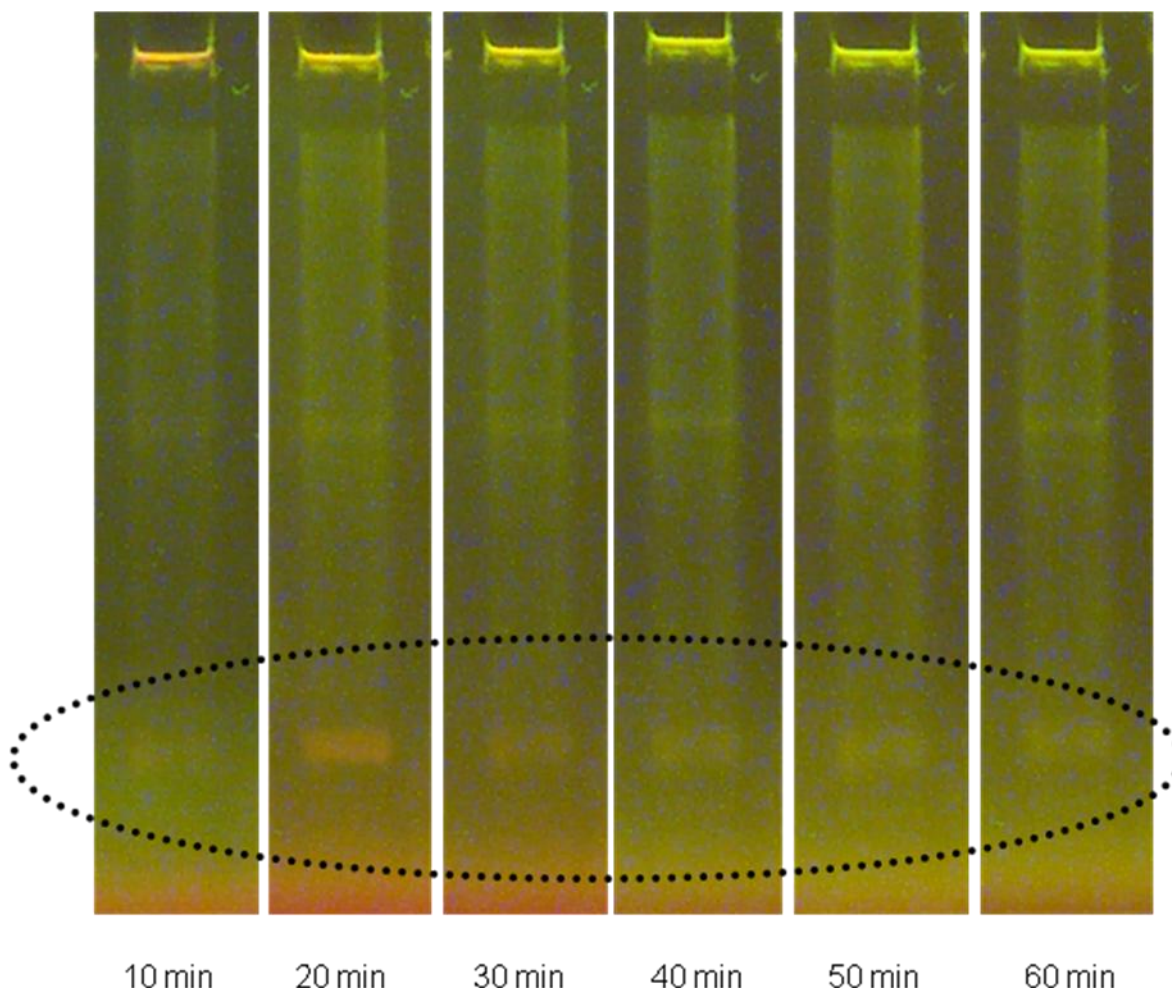


Figura 29: Gel de atividade. Seqüência temporal de atividade em gel nativo 6% incubado com peptídeo fluorogênico. Podemos verificar que a atividade fica mais intensa aos 20 min e a partir daí começa a decrescer. O resultado apresentado é representativo de um conjunto de 3 experimentos.

4.10. Bandas coradas por *Stains-All*

Amostra de sobrenadante de EOMA concentrado em centricon YM100 foi aplicada em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 12% e após a corrida foi corada pela técnica de *Stains-All* (Figura 30). Tal coloração revelou a presença de bandas azuladas que correspondiam aos pesos moleculares entre 27 kDa e 30 kDa, as mesmas que foram reconhecidas pelo anticorpo anti-subunidades de proteassoma nas Figuras 26 e 27. A coloração de proteínas pela técnica de *Stains-All* nos permite identificar proteínas pela gradação de pHs, as mais básicas ficam vermelhas e as mais ácidas azuis. Na faixa correspondente às subunidades de proteassoma, embora exista uma banda de cor rosa, a cor predominante tende ao azul. Esse resultado é compatível com os dados que conhecemos de proteassomas, os quais são proteases que migram bem em gel nativo contínuo confeccionado em pH 8,3, por apresentarem pI em torno de 5.

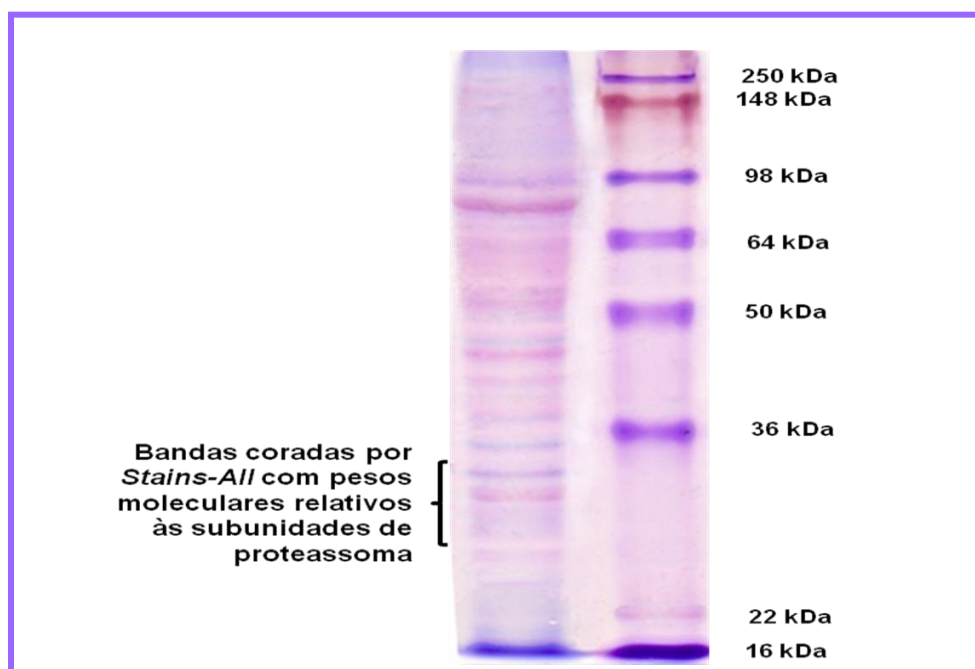


Figura 30: SDS-PAGE 12% corado por *Stains-All*. Bandas coradas pela técnica de *Stains-All*, correspondente ao peso molecular de subunidades de proteassoma, apresentavam cor predominantemente azulada. Este dado é compatível com a característica ácida de proteassomas.

4.11. Proteassoma localizado na fração de *raft* lipídica em *dot blot* de homogeneizado de células EOMA

Um homogeneizado de células EOMA foi transferido para uma membrana de nitrocelulose para verificarmos a presença de proteassoma em *rafts* de membrana através de *dot blot*. O anticorpo primário anti-subunidades de proteassoma e a subunidade B de toxina colérica foram empregados neste experimento. A subunidade B da toxina colérica apresenta alta afinidade por GM1, um gangliosídeo característico de *rafts* lipídicas, ligando-se a ele.

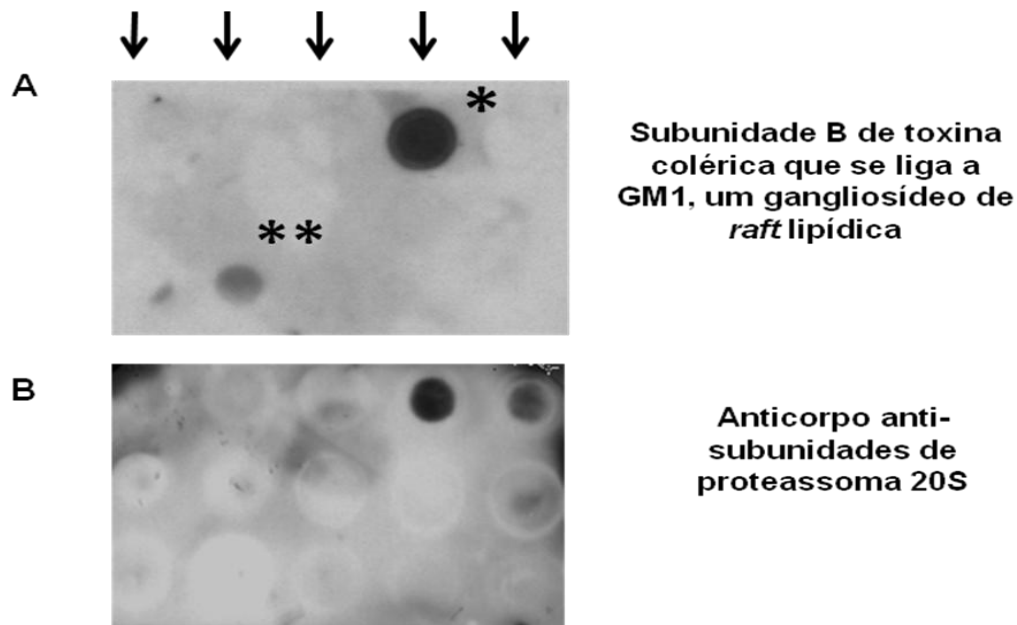


Figura 31: *Dot blot* pareado com emprego de toxina colérica e de anticorpo anti-subunidades de proteassoma. Em A, subunidade B de toxina colérica ligada a GM1, um gangliosídeo característico de *rafts* lipídicas; os *spots* assinalados com 1 e com 2 asteriscos indicam a ligação da toxina colérica a *rafts* lipídicas livres e associadas ao pellet, respectivamente. Em B, *spot* na membrana de nitrocelulose marcado pelo anticorpo anti-subunidades de proteassoma que coincide com o marcado pela toxina colérica em A.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscamos a protease capaz de liberar a endostatina do colágeno XVIII humano. Primordialmente, a protease pesquisada foi extraída de cultura de EOMA, de onde a endostatina foi isolada originalmente. As células EOMA foram escolhidas por representarem um modelo ideal para estudo do processamento do colágeno XVIII por produzirem tanto o substrato colágeno XVIII quanto a atividade proteolítica geradora da endostatina. Imaginávamos inicialmente que a seqüência humana, apresentando dois resíduos pouco palatáveis de prolina nas posições P2 e P3, seria muito difícil de ser hidrolizada. A prolina é um aminoácido que se diferencia dos demais aminoácidos devido ao fato de possuir uma estrutura quimicamente coesa e rígida, sendo mesmo o aminoácido mais rígido dos vinte que são codificados geneticamente. A sua estrutura anelar, devido a ligação da amina alfa terminal (NH₂) a cadeia alifática, lhe confere a classificação de iminoácido (Figura 32). Tal conformação tende a dificultar a ação de proteases em sítios onde a prolina está localizada. Os primeiros resultados com as proteases purificadas, dentre elas a colagenase, catepsina L, elastase e tripsina confirmavam esta suspeita. A seqüência murina, por outro lado, foi bastante suscetível à ação de diversas enzimas, incluindo elastase e catepsina L. Estes resultados confirmavam nossa expectativa de que o sítio de clivagem do NC1 humano exigiria a ação de uma protease mais complexa que a elastase (Wen *et al.*, 1999) ou a catepsina L (Felbor *et al.*, 2000).

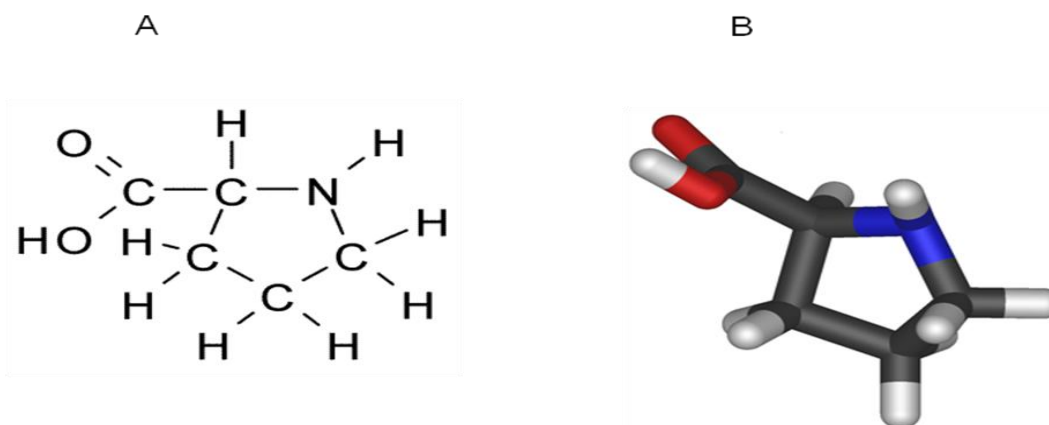


Figura 32: Representação esquemática da prolina. Na figura podemos visualizar a estrutura planar e em 3D da prolina, em A e em B, respectivamente. A presença de anel resultante da ligação da cadeia alifática à amina alfa terminal confere-lhe o título de iminoácido.

No processo de identificação da protease, com a confecção de géis e análise por espectrometria de massa, as proteínas anexina II, anexina V, actina e β -tubulina foram seqüenciadas.

Ao consultar a literatura verificamos que as anexinas são uma família de proteínas multigênicas conservadas evolutivamente, com seus membros sendo expressos através dos reinos vegetais e animais. Pelo menos 20 membros da família das anexinas têm sido descritas até o momento. A anexina II se liga com alta afinidade tanto à actina quanto aos fosfolípídeos ácidos de membrana (Gerke & Moss, 2002). Segundo Rescher & Gerke (2004), a anexina II é uma proteína ligadora do citoesqueleto de actina, associando-a a *rafts* lipídicas. Sabe-se que células tumorais pancreáticas superexpressam anexina II (Paciucci *et al.*, 1998). Tuszynski e colaboradores (2002) demonstraram que a angiostatina, apontada como inibidor do crescimento de câncer de mama e de metástases, liga-se à anexina II de superfície celular, sugerindo um possível envolvimento de anexina II em progressão tumoral. Gately e colaboradores (1997) demonstraram que o plasminogênio pode ser convertido a AS4.5, uma isoforma anti-angiogênica da angiostatina, na superfície de linhagens celulares tumorais humanas, de câncer de

próstata PC-3, de mama MDA-MB231 e fibrossarcoma HT1080, na presença de um complexo de superfície extracelular composto pela anexina II, α -enolase e β -actina. Tal complexo tem sido descrito como receptor do plasminogênio e de tPA (Kwon *et al.*, 2002). Desse modo, tendo em vista que tPA, uma serino-protease, amplamente descrita em ambientes angiogênicos e tumorais e que pode se ligar a anexina II, proteína seqüenciada da fração ativa de EOMA, procuramos empregá-la em nossos testes de atividade proteásica. Contudo, tPA não foi capaz de desempenhar qualquer atividade catalítica sobre o peptídeo fluorogênico humano, mas demonstrou eficácia sobre a clivagem do substrato sintético H-D-Ile-Pro-Arg-pNa. De acordo com Butenas e colaboradores (1997) a serino-protease tPA apresentaria alta afinidade por substratos que possuem resíduos de arginina, na posição P1 e flexibilidade na aceitação de aminoácido hidrofóbicos em P2, sendo que valores de k_{cat} para a hidrólise do substrato aumentariam inversamente com diminuição da hidrofobicidade desses aminoácidos, que se apresentam, a seguir, em ordem crescente de hidrofobicidade: Leu < Val e Gli < Ser < Pro. Além disso, os aminoácidos fenilalanina, leucina e valina, ao invés de resíduos de Ser e Pro na posição P3 do substrato favoreceriam a clivagem por tPA.

Ao procuramos caracterizar a protease presente no sobrenadante de EOMA, seu perfil de inibição foi analisado. Para tanto, todas as classes de inibidores de proteases foram testadas. Contudo, apenas benzamidina e PMSF, inibidores gerais de serino-proteases puderam demonstrar inibição. Desse modo, consultando a literatura encontramos o trabalho de Lee e colaboradores (2000), que caracterizava uma protease capaz de processar o CD44, um receptor de membrana plasmática. Estes autores procuravam em células mioepiteliais que circundam carcinomas *in situ* incipientes, um fator que justificasse a supressão tumoral mediada por estas células. Identificaram uma *shedase* com potencial para liberar o CD44 solúvel a partir da superfície celular. Estes autores descreveram que a *shedase* do CD44 era inibida por inibidores seletivos de quimotripsina, mas, curiosamente, não era afetada pelos inibidores genéricos de serino-proteases. Tal pesquisa motivou-nos a testar a ação dos inibidores

específicos de quimotripsina, TPCK e quimostatina, sobre a atividade de nossa protease. Coincidentemente, a atividade da protease de EOMA, assim como da *shedase* do CD44 em células mioepiteliais, pôde ser inibida por tais inibidores. Contudo, no caso da protease de células mioepiteliais, a adição de quimotripsina exógena foi capaz de mimetizar o efeito da *shedase*, enquanto, em nosso caso, a adição de quimotripsina exógena aos peptídeos fluorogênicos não resultou em atividade proteolítica significativa do peptídeo fluorogênico humano. A quimotripsina, enzima digestiva atuante no intestino delgado, e as enzimas quimotripsina-*like* reconhecem no substrato a extremidade carboxi-terminal de resíduos aromáticos, como tirosina, triptofano e fenilalanina, além de clivar resíduos hidrofóbicos grandes, como a metionina.

Tal resultado nos permitiu reportar à teoria do pesquisador John Beard, que defendia o emprego da associação tripsina-quimotripsina e de seus zimogênios no tratamento do câncer. Segundo Beard (1905), as proteases administradas parenteralmente, de forma empírica, levavam, em muitos casos, à regressão tumoral e, em algumas vezes, a sua remissão por completo. Tal teoria tem sido lembrada, um século depois, por Novak & Trnka (2005), que demonstram, com a associação de tripsina-quimotripsina ao meio de cultura celular de células tumorais, a diminuição do potencial migratório dessas células, bem como a alteração do citoesqueleto, que não apresentam a polaridade necessária à migração. Estes pesquisadores atribuem aos fatores anti-angiogênicos, como a endostatina, tal efeito anti-tumoral. Em consonância ao pensamento destes pesquisadores, trabalhos vêm atribuindo à endostatina papéis anti-tumoral e anti-angiogênico, embora este último atributo tenha sido o primeiro dos dois a ser descoberto. Novak & Trnka (2005) acreditam que a endostatina poderia estar sendo produzida por protease tipo quimotripsina em ambiente tumoral e, para embasar esta hipótese, citam o trabalho de Ständker (1997), que sugere a mesma possibilidade.

Segundo Keesey (1987), embora a especificidade primária da quimotripsina seja clivar após os resíduos de tirosina, fenilalanina e triptofano,

aminoácidos aromáticos, pode também cortar no C-terminal dos aminoácidos leucina, metionina e alanina, sendo, por isso, classificada como uma protease de amplo espectro. Além disso, Powers e colaboradores (1985) verificando a atividade de enzimas tipo quimotripsina como as proteases I e II de células de mastócitos de ratos e quimases da pele de cachorros, concluíram que estas enzimas preferem um resíduo aromático em P1 e resíduos hidrofóbicos em P2 e P3, sendo os resíduos de prolina os de eleição para estas posições. Ao incubarmos a protease de EOMA com peptídeo fluorescente em alta concentração, pudemos constatar que dois fragmentos eram gerados, RPTSPPA e HSHRQ, o que veio a confirmar ser esta protease capaz de gerar a endostatina completa contendo as três histidinas e com capacidade de abrigar o íon zinco o que lhe confere conformação apropriada para exercer atividade antiangiogênica.

Dick e colaboradores (1998), empregando subunidades inativadas do *core* protéico do proteassoma 26S, ou proteassoma 20S, de leveduras, demonstraram que todas as suas três subunidades catalíticas, β 1, β 2 e β 5, poderiam clivar após aminoácidos hidrofóbicos pequenos, como a alanina, atuando cooperativamente. Contudo, a subunidade tipo quimotripsina, a β 5, era a que apresentava maior atividade, mesmo quando comparada com o proteassoma tipo selvagem. Sabe-se, atualmente, que a região que antecede o ponto de clivagem da endostatina humana e que faz parte do segmento central do NC1 sujeito a proteólises, é considerada pouco estruturada, composta pelos aminoácidos alanina, prolina e serina. Segundo Linding e colaboradores (2003), aminoácidos como a prolina, serina, treonina, lisina e metionina são responsáveis pela criação de regiões não estruturadas nas proteínas, as quais podem ser visualizadas por NMR. Tais regiões se apresentam como *loopings* e *coils* na estrutura das proteínas, os quais parecem se constituir em sítios preferenciais de clivagem pelos proteassomas. Asher & Shaul (2005) sugerem que regiões não estruturadas de substratos favoreceriam a catálise pelos proteassomas 20S, como as apresentadas por p53 e I κ B-NF κ B e curiosamente presente no NC1 do

colágeno XVIII, em especial no sítio de clivagem que antecede a geração da endostatina.

Neste trabalho verificamos que a fração mais purificada de EOMA apresentava o mesmo perfil de inibição dos sobrenadantes de EOMA. Além disso, ao testarmos dois novos inibidores, o AEBSF, inibidor geral de serino-proteases e o MG132, um inibidor de proteassoma e de proteases lisossomais, pudemos constatar que tanto o AEBSF, nas concentrações de 1 mM e 10 mM, quanto MG132, nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M puderam inibir a atividade da fração testada. Segundo Kisselev e colaboradores (1999), o AEBSF funciona como um potente inibidor irreversível da subunidade tripsina-*like* de proteassomas, podendo inibir 90% de sua atividade, enquanto não atua sobre suas outras duas subunidades. Desse modo, tendo em vista ter sido a protease de EOMA inibida 50% por AEBSF a 10 mM e quase totalmente por MG132 a 10 μ M, ampliamos a análise do conceito da classe da protease pesquisada de serino para treonino-protease, acreditando ser esta um proteassoma, devido a este e a outros indícios que nos permitiram confirmar esta hipótese. Moriyasu e Malek (2004) afirmam, ainda, que a atividade do proteassoma 20S de alga *Charophyceae*, *Chara corallina* pôde ser inibida por diferentes classes de inibidores, dentre os quais leupeptina, antipaína, PMSF e o-fenantrolina, na presença de SDS.

Segundo Baumaster e Lupas (1997), proteassomas, que apresentam o resíduo treonina no sítio catalítico em seu N-terminal nucleófilo e acceptor de prótons, continuam igualmente ativos caso sofram mutações consideradas aceitáveis, as que poderiam substituir a treonina por resíduos de serina ou de cisteína. Além disso, estudo realizado por Moryasu e Malek (2004), pôde constatar que a atividade catalítica sobre o substrato sintético Suc-LLVY-MCA era tanto inibida por quimostatina como também por MG132. Tal inibição permitiu-lhes concluir que o sítio catalítico do tipo quimotripsina do proteassoma de eucariotos era sensível a inibidores de serino e de treonino-proteases. Segundo Fuertes e colaboradores (2003), o inibidor MG132 não inibe exclusivamente proteassomas, podendo inibir também cisteíno-proteases lisossomais. Contudo, os inibidores de

cisteíno-proteases e de aspartil-proteases, testados em nossa pesquisa, não puderem inibir a protease pesquisada.

Através de microscopia eletrônica de transmissão empregando-se a técnica de constrastação negativa, pudemos visualizar uma estrutura semelhante à de um barril, em tomada lateral, e a de um disco, quando visto de cima, proveniente da fração ativa de EOMA. Essas imagens são compatíveis com as de um proteassoma, que tem sido bem caracterizado em diversos trabalhos (Vaithilingam *et al.*, 1995; Cascio *et al.*, 2002; Fonseca & Morris, 2008).

Além disso, pudemos constatar que a atividade dos sobrenadantes das células tumorais testadas se concentrava nas frações 6 e 11, que correspondem a pesos moleculares acima de 669 kDa. Como sabemos, o proteassoma 26S, também conhecido como holoproteassoma, apresenta peso molecular entre 1.500.000 Da e 2.000.000 Da. O peso molecular da fração 11 é compatível com o proteassoma 20S, que apresenta aproximadamente 700 kDa (Zoeger *et al.*, 2006 e Sixt *et al.*, 2007). Segundo Zoeger e colaboradores (2006), a presença de proteassomas 20S circulantes no plasma de indivíduos saudáveis e com lúpus eritematoso e artrite reumatóide pôde ser observada. Tais pesquisadores demonstraram a existência de diferentes subtipos de proteassomas 20S plasmáticos que diferiam entre indivíduos saudáveis e doentes. Enquanto os primeiros apresentavam seis subtipos, os últimos apresentavam sete, um a mais dos existentes em pessoas sadias. De acordo com a análise deste grupo, essa diferença poderia refletir o estado de doença dos indivíduos portadores de sete subtipos, podendo ser a base para o desenvolvimento de um novo sistema de teste diagnóstico para se detectar, precocemente, enfermidades e se monitorar as terapias empregadas para combatê-las. A presença de proteassoma 20S extracelular também foi descrito recentemente em trabalho de Sixt e colaboradores (2007). Foi demonstrada sua presença em lavado broncoalveolar, não associado à fração contendo células, ou seja, livre no sobrenadante. Esse resultado é compatível com o observado em nossa pesquisa. Um outro dado interessante deste trabalho que está de acordo com os obtidos em nossa

pesquisa, diz respeito ao controle de possível rompimento das células do epitélio pulmonar com liberação de proteassoma para o meio extra celular. Assim como os testes por nós empregados, a contagem de células vivas e mortas e a ausência de correlação entre a atividade do lavado e a lactato desidrogenase, um marcador de rompimento celular, descartaram a possibilidade de lise celular no trabalho deste grupo. Segundo suposição destes pesquisadores, os proteassomas 20S broncoalveolares poderiam estar atuando fisiologicamente na manutenção da pressão osmótica e da purificação do ambiente pulmonar ao degradar proteínas indesejáveis.

Os resultados obtidos em testes de atividade proteásica tanto sobre o peptídeo sintético quanto sobre o NC1 recombinante humano e colágeno XVIII de células HUVEC demonstraram a existência de atividade diferenciada em células tumorais. Tais resultados podem ser comparados a um trabalho publicado por Kumatori e colaboradores (1990) que demonstraram pela primeira vez altos níveis de expressão anormal de proteassomas em células leucêmicas humanas. Outros pesquisadores publicaram em anos seguintes dados demonstrando que tanto a quantidade quanto a composição das subunidades do proteassoma variavam entre as células neoplásicas e as normais (Henry *et al.*, 1996; Bureau *et al.*, 1997a; Baz *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 1997). Wada e colaboradores (1993) demonstraram a existência de proteassomas presentes no soro de pacientes portadores de malignidades hematológicas e seu possível significado patofisiológico. Além destes pesquisadores, outros tantos demonstraram a existência de proteassomas no plasma de indivíduos saudáveis (Sixt & Dahlmann, 2008) e altos níveis em pacientes apresentando especialmente tumores sólidos (Stoebner *et al.*, 2005), leucemias (Lavabre-Bertrand *et al.*, 2001) e doenças autoimunes (Ergerer *et al.*, 2002). Segundo Dutaud (2002), proteassomas extracelulares podem ser quantificados por ELISA. Estes pesquisadores demonstraram que pacientes portadores de tumores sólidos podem apresentar entre 1000 e 10000 ng/ml de proteassoma circulante, enquanto indivíduos-controle normais, no máximo, 3000 ng/ml de proteassoma plasmático.

Além dos testes de atividade realizados no fluorímetro em nosso trabalho, testamos o funcionamento da protease também com o emprego de gel nativo confeccionado com o sobrenadante de EOMA concentrado no centricon YM 100. Neste teste, procuramos utilizar um tampão semelhante ao empregado no trabalho de Moriyasu & Malek (2004), que era composto por tampão tris-HCl, pH 7, ao qual se adicionava SDS 0,03%, CaCl₂ 5 mM e MgCl₂ 5 mM, em géis de atividade com proteassoma 20S, empregando peptídeo sintético Suc-LLVY-MCA. De acordo com estes pesquisadores a maior hidrólise de Suc-LLVY-MCA era observada quando o pH ótimo do tampão era empregado, o qual variava entre 7,0 e 8,5. Em nossa pesquisa, constatamos, igualmente, que esta faixa de pH era ideal para a proteólise do peptídeo fluorogênico empregado (Figura 18). Segundo Reshetnyak e colaboradores (2004), a adição de SDS e de íons mono e divalentes em tampões empregados em testes de atividade com proteassomas 20S levam a mudanças estruturais de suas subunidades o que favoreceria uma conformação mais aberta deste proteassoma, permitindo um melhor acesso do substrato ao interior da câmara proteolítica e um aumento da atividade quimotripsina-*like*.

Objetivando obter mais informações sobre a composição das bandas presentes em SDS-PAGE do sobrenadante de EOMA concentrado em centricon YM 100, realizamos um processo de coramento deste gel com um corante denominado *Stains-All*. As bandas coradas por *Stains-All* apresentam matizes que variam da cor vermelha a azul, estando o significado das cores relacionado ao grau de acidez das bandas coradas por este processo. As bandas se apresentam coradas em azul quando muito ácidas, em violeta, quando pouco ácidas e em vermelho, quando básicas. As que correspondiam aos pesos moleculares de proteassoma 20S apresentavam-se predominantemente em tons azulados. Além de sabermos que os proteassomas apresentam pI em torno de 5, o que lhe confere uma condição mais ácida, Pouch e colaboradores (1995) afirmam que proteassomas podem se ligar a muitos diferentes tipos de RNA que variam de 80 a 120 nucleotídeos e que parecem fazer parte desse complexo. Contudo sabe-se que RNA não é parte estrutural do proteassoma.

Em nosso trabalho, pudemos observar com a confecção de géis nativos e de bandas marcadas por anticorpo anti-subunidades de proteassoma 20S a existência de bandas que migraram em alturas diferentes. Segundo Drews e colaboradores (2007), existem diferentes subpopulações de proteassomas no coração, com pI em torno de 5, que apresentam nuances na atividade de sua subunidades catalíticas. Modificações pós-traducionais levariam a sutis variações em torno deste pI , o que poderia indicar alterações na porcentagem das subunidade do proteassoma. Assim, como exemplo, um pI de 5,21 seria indicativo da presença de menos de 58% da subunidade $\beta 2i$ no proteassoma quando comparado com aquele de pI 5,26. Além disso, esses pesquisadores sugerem que o pI de proteassomas poderia ser alterado, adicionalmente, devido a desfosforilações. Desse modo, acreditamos que diferentes alterações possam estar ocorrendo em proteassomas liberados para o sobrenadante das células EOMA. Além disso, uma outra possibilidade da presença de bandas em diversas alturas, reveladas em *western blot* de SDS-PAGE 12% de sobrenadante de EOMA e da fração mais purificada, seja decorrente do processo de desnaturação insuficiente do proteassoma, mesmo empregando-se SDS, β -mercaptoetanol e fervura por 1-5 min. Segundo Pouch e colaboradores (1995), o proteassoma 20S é muito estável, resistente *in vitro* a alta força iônica e a detergentes como o lauroilsarcosinato 1%.

De acordo com a literatura, proteassomas 20S são constituídos por subunidades cujos pesos moleculares variavam de 19 kDa a 35 kDa (Pouch *et al.*, 1995) ou de 26 kDa a 32 kDa (Moriyasu & Malek, 2004) ou, ainda, de 22 kDa a 32 kDa (Drews *et al.*, 2007). Segundo Drews e colaboradores (2007) as subunidades de proteassoma 20S são dispostas em nove bandas em SDS-PAGE 12%, ficando assim dispostas de cima para baixo: 1a banda) $\alpha 6$; 2a banda) $\alpha 7$ e $\alpha 3$; 3a banda) $\beta 2$; 4a banda) $\alpha 4$; 5a banda) $\alpha 5$; 6a banda) $\alpha 1$; 7a banda) $\alpha 2$, $\beta 3$, $\beta 6$ e $\beta 7$; 8a banda) $\beta 1$ e $\beta 4$ e 9a banda) $\beta 5$. Desse modo, em nosso trabalho, procuramos seqüenciar as bandas que correspondiam aos pesos moleculares entre 19 kDa e 35 kDa presentes em SDS-PAGE de concentrado de sobrenadante de EOMA em

centricon YM 100. A razão para se escolher este gel ao invés de SDS-PAGE da fração 6 deveu-se ao fato das bandas entre estes pesos moleculares estarem menos visíveis neste último gel, mesmo se corado com técnica sensível para visualização de bandas que apresentam pouca massa, como o coramento com comassie blue coloidal ou prata. Desse modo, pudemos seqüenciar a subunidade $\alpha 2$ do proteassoma 20S. Tal banda correspondia ao peso molecular da banda que pôde ser reconhecida por anticorpo anti-subunidades de proteassoma empregado em *western blot* da fração 6 e do concentrado do sobrenadante de EOMA injetados em SDS-PAGE 12%. Tal resultado pôde confirmar nossas suspeitas de ser um proteassoma a protease capaz de clivar o colágeno XVIII, *in vitro*, gerando endostatina.

Bureau e colaboradores (1997b) caracterizaram proteassomas como antígenos de superfície celular em subpopulação de linfócitos humanos. Segundo Dhungana e colaboradores (2008), a concentração de proteassomas 20S torna-se aumentada em superfície celular de macrófagos estimulados por lipopolisacarídeos. Microscopia confocal e imunocitoquímica demonstraram um aumento do recrutamento de proteassomas em *rafts* lipídicas no trabalho supracitado. Em uma de nossas primeiras tentativas de seqüenciamento em que foram seqüenciadas proteínas de alto peso molecular (38-100 kDa), verificamos a presença das proteínas anexinas II e V. Essas proteínas estão sabidamente associadas a *rafts* lipídicas, da mesma forma que os proteassomas não citoplasmáticos encontrados em células tumorais. Assim, poderíamos imaginar que a protease geradora da ES humana estaria localizada nessas estruturas juntamente com os marcadores anexinas II e V.

Ao final deste trabalho concluímos ser a protease geradora da endostatina humana, uma protease solúvel, apresentando atividade extracelular e preferencialmente expressa em células tumorais, características compatíveis com proteassomas ativos extracelularmente.

Uma das perspectivas abertas deste trabalho é o desenvolvimento de um novo procedimento diagnóstico tendo por base a identificação desta protease.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1. A protease geradora da endostatina humana possui as subunidades presentes em proteassoma.

6.2. A protease reconhece o substrato natural, produzindo endostatina.

6.3. Portanto, a protease geradora da endostatina humana é um proteassoma extracelular.

7. REFERÊNCIAS

- Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, Gröne H-J, Debus J, Ansorge W, Folkman J, Hlatky L and Huber PE. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol Cell*, 13: 649-663, 2004.
- Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K and Ichihara A. Interferon- γ induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem (Tokyo)*, 115: 257-269, 1994.
- Armstrong WB, Kennedy AR, Wan XS, Taylor TH, Nguyen QA, Jensen J, Thompson W, Lagerberg W and Meyskens FL Jr. Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrated in a phase IIa chemoprevention trial. *Clin Cancer Res*, 6 (12): 4684-4691, 2000.
- Asher G & Shaul Y. p53 proteasomal degradation. Poly-ubiquitination is not the whole story. *Cell Cycle*, 4 (8); 1015-1018, 2005.
- Ausprunk DH & Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*, 14: 53-65, 1977.
- Baenziger NL, Brodie GN & Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:240-243, 1971.
- Bagavandoss P & Wilks JW. Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun*, 170: 867-872, 1990.
- Baish JW and Jain RK. Fractals and Cancer. *Cancer Res*, 60: 3683-3688, 2000.
- Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D and Foidart JM. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med*, 4: 923-928, 1998.
- Barret AJ, Rawlings ND and Woessner JF (editors). *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, pp xxx + 1666, 1998.
- Baumaster W & Lupas A. The proteasome. *Curr Op Struct Biol*, 7: 273-278, 1997. Baz A, Henry L, Caravano R, Scherrer K, Bureau JP. Changes in the

- subunit distribution of prosomes (MCP-proteasomes) during the differentiation of human leukemic cells. *Int J Cancer*, 72: 1-10, 1997.
- Beard J. The Cancer Problem. *The Lancet*, 168: 281-283, 1905.
- Benny O, Fainaru O, Adini A, Cassiola F, Bazinet L, Adini I, Pravda E, Nashmias Y, Koirala S, Corfas G, D'Amato RJ and Folkman J. An orally delivered small-molecule formulation with antiangiogenic and anticancer activity. *Nat biotechnol*, 26 (7): 799-807, 2008.
- Berger G & Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews*, 3: 401-410, 2003.
- Bloch W, Huggel K, Sasaki T, Grose R, Bugnon P, Addicks K, Timpl R and Werner S. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. *FASEB J*, 14: 2373-2376, 2000.
- Boehm T, Folkman J, Browder T and O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390 (6658): 404-407, 1997.
- Boehm T, O'Reilly MS, Keough K, Shiloach J, Shapiro R and Folkman J. Zinc-binding of endostatin is essential for its antiangiogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 252 (1): 190-194, 1998.
- Bornstein P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest*, 107: 929-34, 2001.
- Brammer RD, Bramhal, SR and Eggo MC. Endostatin expression in pancreatic tissue is modulated by elastase. *British Journal of Cancer*, 92: 89-93, 2005.
- Braun B, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D and Schmidt M. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nature Cell Biol*, 1: 221-226, 1999.
- Browder T, Folkman J and Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem*, 275: 1521-1524, 2000.
- Bureau JP, Henry L, Baz A, Scherer K and Château MT. Prosome (proteasome) changes during differentiation are related to the type of inducer. *Mol Biol Rep*, 24: 57-62, 1997a.

- Bureau JP, Olink-Coux M, Brouard N, Bayle-Julien S, Huesca M, Herzberg M and Scherrer K. Characterization of prosomes in human lymphocyte subpopulations and their presence as surface antigens. *Exp Cell Res*, 231: 50-60, 1997b.
- Burke PA & DeNardo SJ. Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. *Crit Rev Oncol Haematol*, 39: 155-171, 2001.
- Butenas S, Kalafatis M and Mann KG. Analysis of tissue activator specificity using peptidyl fluorogenic substrates. *Biochemistry*, 36: 2123-2131, 1997.
- Campbell KP, MacLennan DH and Jorgensen AO. Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-All". *J Biol Chem*, 258 (18): 11267-11273, 1983.
- Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int. J Biochem Cell Biol*, 33: 357-369, 2001.
- Cascio P, Call M, Petre B M, Walz T and Goldberg AL. Properties of hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *EMBO J*, 21 (11): 2636-2645, 2002.
- Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A and Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis complex partnerships. *Cell Mol Life Sci*, 63 (5): 601-615, 2006.
- Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA) II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol Chem*, 269 (33): 21198-21203, 1994.
- Chen H, Herdon ME and Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol*, 19: 597-614, 2000.
- Chiang Y, Rizzino A, Sibenalle ZA, Wold MS and Vishwanatha JK. Specific down-regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation. *Mol Cell Biochem*, 199 (1-2): 139-147, 1999.
- Ciardello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Fontanine G, Cuccato S, De Placido S, Bianco AR and Tortora G. Inhibition of growth factor production and

- angiogenesis in human cancer cells by ZD 1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*, 7: 1459-1465, 2001.
- Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M and Folkman J. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5579-5583, 1998.
- Collen A, Henemaaijer R, Lupu F, Quax PHA, van Lent N, Grimbergen J, Peters E, Koolwijk P and van Hinsberg VWM. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood*, 101 (5): 1810-1817, 2003.
- Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, Volk R, Zamborsky ED, Herman S, Sarkar PK, Ericksen MB, Dhanabal M, Simons M, Post M, Kufe DW, Weichselbaum RR, Sukhatme VP and Kalluri R. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res*, 60(9): 2520-2526, 2000.
- Craig C and Stitzel R (editors). *Modern pharmacology with clinical applications*. 5th ed. Boston: Little, Brown, 1997.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T and Claesson-Welsh L. VEGF-receptors signal transduction. *Trends Biochem Sci*, 28 (9): 488-494, 2003.
- Davie EW & Neurath, H. Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. *J Biol Chem*, 212: 515–529, 1955.
- Davie EW & Ratnoff OD. Waterfall sequence forintrinsic blood clotting. *Science* 145: 1310–1312, 1964.
- Dezube BJ, Von Roenn JH, Holde-Wiltse J, Cheung TW, Remick SC, Cooley TP, Moore J, Sommadossi JP, Shriver SL, Suckow CW and Gill PS. Fumagillin analog in the treatment of Kaposi's sarcoma: a phase I AIDS clinical trial group study. AIDS clinical trial group no. 215 team. *J Clin Oncol*, 16 (4): 1444-1449, 1998.

- Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, Lu H, Knebelmann B, Segal M and Sukhatme VP. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*, 274 (17): 11721-11728, 1999.
- Dhungana S, Merrick BA, Tomer KB and Fessler MB. Quantitative proteomic analysis of macrophage rafts reveals compartmentalized activation of the proteasome and of proteasome-mediated ERK activation in response to lipopolysaccharide. *Mol & Cell Proteomics* in press, 2008.
- Di Pietro LA, Nebcen DR and Polverini PJ. Downregulation of endothelial cell thrombospondin-1 enhances in vitro angiogenesis. *J Vasc Res*, 31: 178-185, 1994.
- Dick TP, Nussbaum AK, Deeg M, Heinemeyer W, Groll M, Schirle M, Keilholz W, Stevanovic S, Wolf DH, Huber R, Rammensee H-G and Schild H. Contribution of proteasomes β -subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem*, 273 (40): 25637-25646, 1998.
- Ding YH, Javaherian K, Lo KM, Chopra R, Boehm T, Lanciotti J, Harris BA, Lee Y, Shapiro R, Hohenester E, Timpl R, Folkman J and Wiley DC. Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (18): 10443-8, 1998.
- Dixelius J, Cross M, Matumoto T, Sasaki T, Timpl R and Claesson-Welsh I. Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeleton organization. *Cancer Res*, 62: 1944-1947, 2002.
- Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, et al. Endostatin induced tyrosine-kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood*, 95: 3403-3411, 2000.
- Dong Z, Kumar R, Yang X and Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell*, 88: 801-10, 1997.
- Dreus O, Wildgruber R, Zong C, Sukop U, Nissum M, Weber G, Gomes AV and Pincus P. Mammalian proteasome subpopulations with distinct molecular

- compositions and proteolytic activities. *Mol & Cell Proteomics*, 6: 2021-2031, 2007.
- Duh EJ, Yao YG, Dagli M and Goldberg MF. Persistence of fetal vasculature in a patient with Knobloch syndrome: potential role for endostatin in fetal vascular remodelling of the eye. *Ophthalmology*, 111 (10): 1885-1888, 2004.
- Dutaud D, Aubry L, Henry L, Levieux D, Hendil KB, Kuehn L, Bureau JP and Ouali A. Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *J Immunol Methods*, 260 (1-2): 183-193, 2002.
- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315: 1650-1659, 1986.
- Dvorak HF. Abnormalities of hemostasis in malignancy. *In* Colman RW, Hirsch J, Marder VJ and Saltzman EW. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Philadelphia: JB Lipincott Company, 1238-1254, 1994.
- Dvorak HF, Naggy JA, Feng D, Brown LF and Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 237: 97-132, 1999.
- Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH and Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res*, 60: 1388-1393, 2000.
- Eeckhout Y & Vaes G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein and spontaneous activation. *Biochem J*; 166: 21-31, 1977.
- Emmert-Buck MR, Roth MJ, Zhuang Z, Campo E, Rozhin J, Sloane BF, Liotta LA and Stetler-Stevenson WG. Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. *Am J Pathol*, 145: 1285-90, 1994.

- Enns A, Cassmann P, Schlüter K, Korb T, Spiegel H, Senninger N and Haier J. Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. *J Gastroint Surg*, 8 (8): 1049-1060, 2004.
- Ergerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Ruckert JC, Dorner T, Burmester GR, Kloetzel PM and Feist E. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity and an autoimmune diseases. *J Rheumatol*, 29: 2045-2052, 2002.
- Farias SL, Sabatini RA, Coelho-Sampaio T, Hirata IY, Cezari MHS, Juliano MA, Sturrock ED, Carmona AK and Juliano L. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor peptides derived from the endostatin-containing NC1 fragment of human collagen XVIII. *Biol Chem*, 387: 611-616, 2006.
- Felbor U, Dreier L, Bryant RAR, Ploegh HL, Olsen BR and Mothes W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J*, 19 (6): 1187-1194, 2000.
- Feldman AL, Alexander HR Jr, Yang JC, Linehan M, Eyler RA, Miller MS, Steinberg SM and Libbuti SK. Prospective analyses of circulating endostatin levels in patients with renal cell carcinoma. *Cancer*, 85 (8), 1637-1643, 2002.
- Feng D, Nagy J, Dvorak HF and Dvorak AM. Ultrastructural studies define soluble macromolecular, particulate, and cellular transendothelial cell pathways in venules, lymphatic vessels, and tumor-associated microvessels in man and animals. *Microsc Res Tech*, 57: 289-326, 2002.
- Ferreras M, Felbor U, Lemhard T, Olsen BR and Dellaissé JM. Generation and cegradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett*, 486: 247-251, 2000.
- Folkman J. Tumour angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285: 1182-1186, 1971.
- Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*, 43: 175-203, 1985.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and others disease. *Nat Med*, 1: 27-31, 1995.
- Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Sem Cancer Biol*, 13 (12): 159-167, 2003.

- Folkman J & Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*, 138: 745-753, 1973.
- Folkman J & Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science (Wash DC)*, 235: 442-447, 1987.
- Fong GH. Mechanisms of adaptative angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis*, 11: 121-140, 2008.
- Fonseca PC & Morris EP. Structure of the human 26S proteasome. *J Biol Chem*, 283 (34): 23305-23314, 2008.
- Frohlich M, Motte P, Galvin K, Takahashi H, Wands J and Ozturk M. Enhanced expression of the protein kinase substrate p36 in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biol*, 10 (6): 3216-3223, 1990.
- Fuertes G, Martín de Llano JJ, Villarroya A, Rivett AJ and Knecht E. Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J*, 375: 75-86, 2003.
- Fukai N, Eklund L, Marneros AG, Oh SP, Keene DR, Tamarkin L, Niemela M, Ilves M, Li E, Pihlajaniemi T and Olsen BR. Lack of collagen XVIII/ endostatin results in eye abnormalities. *EMBO J*, 21: 1535-1544, 2002.
- Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C and Kraft A. Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncology*, 54 (3): 177-184, 1997.
- Gately S, Twardowski P, Stack MS, Cundiff DL, Grella D, Castellino FJ, Enghild J, Kwaan HC; Lee F, Kramer RA, Volpert O, Bouck N and Soff GA. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 10868-10872, 1997.
- Ge M, Tang G, Ryan TJ and Malik AB. Fibrinogen degradation product fragment D induces endothelial cell detachment by activation of cell-mediated fibrinolysis. *J Clin Invest*, 90:2508-2516, 1992.

- Gerke V. Tyrosine protein kinase substrate p36: a member of the annexin family of Ca^{2+} / phospholipid binding proteins. *Cell Motil Cytoskeleton*, 14 (4): 449-454, 1989.
- Gerke V & Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, 82 (2): 331-371, 2002.
- Gerke V & Weber K. Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO J*, 3 (1): 227-233, 1984.
- Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Lila V, Réganon E, Castelló RM, Chirivella M and Estellés A. Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Hum Reprod*, 22 (8): 2120-2127, 2007.
- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA & Bouck NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 6624-6628, 1990.
- Guo N-H, Krutzsch HC, Inman JK, Shannon CS and Roberts DD. Anti-proliferative and antitumor activities of D-reversed peptides derived from the second type 1 repeat of thrombospondin-I. *J Pept Res*, 50: 210-221, 1997.
- Gutheil JC, Hait SR, Belani CP, Melera PW and Hussaim A. Alterations in Ca^{2+} transport ATPase and P-glycoprotein expression can mediate resistance to thapsigargin. *J Biol Chem*, 269 (11): 7976-7981, 1994.
- Häggström M. VEGF receptors.png. www.wikipedia.com. VEGF-receptors.svg., 2008.
- Hajjar KA, Jacovina AT and Chacko J. An endothelial cell receptor for plasminogen/ tissue plasminogen activator. Identity with annexin II. *J Biol Chem*, 269: 21291-21197, 1994.
- Halfter W, Dong S, Schurer B and Cole GJ. Collagen XVIII is a basement membrane heparin sulfate proteoglycan. *J Biol Chem*, 273 (39): 25404-25412, 1998.

- Hamano Y & Kalluri R. Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. *Bioch Bioph Res Com*, 333(2): 292-298, 2005.
- Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively JC, Maeshima Y, Yang C, Hynes RO, Werb Z, Sudhakar A and Kalluri R. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaVbeta3 integrin. *Cancer Cell*, 3(6): 589-601, 2003.
- Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, Albanese C, Waterman M, Chan B, Ramchandran R, Pestell R and Sukhatme VP. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem*, 277: 16464-16469, 2002.
- Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *THE LANCET* 355: 165-168, 2000.
- Henry L, Baz A, Château MT, Caravano R, Scherer K and Bureau JP. Prosome (proteasome) subunit variations during the differentiation of myeloid U937. *Anal Cell Pathol*, 15: 131-144, 1997.
- Henry L, Baz A, Château MT, Scherer K and Bureau JP. Changes in the amount and distribution of prosomal subunits during the differentiation of U937 myeloid cells: high expression of p23K. *Cell Prolif*, 29: 589-607, 1996.
- Herbst RS, Hidalgo M, Pierson AS, Holden SN, Bergen M and Eckhardt SG. Angiogenesis inhibitors in clinical development for lung cancer. *Semin Oncol*, 29 (1 suppl. 4): 66-77, 2002.
- Hershko A. Early work on the ubiquitin proteasome system, an interview with Avram Hershko. *Cell Death Differ*, 12: 1158-1161, 2005.
- Hirata IY, Cezari MHS, Nakaie C, Boschov P, Ito AS, Juliano M and Juliano L. Internally quenched fluorogenic protease substrates: solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. *Lett Peptide Sci*, 1: 99-308, 1994.

- Hoak JC, Warner ED, Cheng HF, Fry GL and Hankenson RR. Hemangioma with thrombocytopenia and microangiopathic anemia (Kasabach-Merritt syndrome): an animal model. *J Lab Clin Med*, 77: 941-950, 1971.
- Hohenester E, Sasaki T, Olsen BR and Timpl R. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1,4 Å resolution. *EMBO J*, 17 (6): 1656-1664, 1998.
- Hou WH, Wagn T-Y, Yuan B-M, Chai Y-R, Jia Y-L, Tian F, Wang J-M and Xue L-X. Recombinant mouse Canstatin inhibits chicken embryo chorioallantoic membrane angiogenesis and endothelial cell proliferation. *Act Bioch Bioph Sinica (Shanghai)*, 36(12): 845-850, 2004.
- Hunt TK, Knighton DR, Thakral KK, Goodson WH and Andrews WS. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated macrophages. *Surgery*, 96: 48–54, 1984.
- Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, *et al.* Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature*, 348: 555-557, 1990.
- Iughetti P, Suzuki O, Godoi PH, Alves VAF, Sertié AL, Zorick T, Soares F, Camargo A, Moreira ES, di Loreto C, Moreira Filho CA, Simpson A, Oliva G and Passos-Bueno MR. A polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, predisposes for the development of prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 61(20):7375–7378, 2001.
- Izume Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D & Jain RK. Tumor biology: Herceptin acts as na anti-angiogenic cocktail. *Nature*, 416: 279-280, 2002.
- Jaffe EA, Hoyer LW and Nachman RL. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 52 (11): 2757-2764, 1973.
- Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, Hopfer H, Ramchandran R, Torre A, Maeshima Y, Mier JW, Sukhatme VP and Kalluri R. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem*, 275(2): 1209-1215, 2000.

- Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B, Dhanabal M, Hanai JI, Venkataranan G, Shriver Z, Keiser N, Kalluri R, Zeng H, Mukhopadhyay D, Chen RL, Lander AD, Hagihara K, Yamaguchi Y, Sasisekharan R, Cantley L and Sukhatme VP. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol Cell*, 7: 811-822, 2001.
- Keesly J. Biochemica Information.Boehringer-Manheim Biochemicals, Indianapolis, 1987.
- Kerbel R & Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Rev Cancer*, 2: 727-739, 2002.
- Keutzer JC and Hirschhorn RR. The growth-regulated gene 1B6 is identified as the heavy chain of calpactin I. *Exp Cell Res*, 188 (1): 153-159, 1990.
- Kim Y-M, Hwang S, Kim Y-M, Pyun B-J, Kim T-Y, Lee S-T, Gho YS and Kwon Y-G. Endostatin blocks vacular endothelial growth factor mediated signaling via direct interation with KDR/Flk-1. *J Biol Chem*, 277: 27872-27879, 2002.
- Kim Y-M, Jang JW, Lee O-H, Yeon J, Choi E-Y, Kim K-W, Lee S-T and Kwon Y-G. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity and matrix metalloproteinase. *Cancer Res*, 60: 5410-5413, 2000.
- King, RJB. *Cancer Biology* (Longman Essex), 1996.
- Kirsch M, Schackert G & Black PM. Angiogenesis, metastasis and endogenous inhibition. *J Neuro-Oncol*, 50: 173-180, 2000.
- Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM and Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. *J Biol Chem*, 274 (6): 3363-3371, 1999.
- Klagsbrun M & D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Facto Rev*, 7 (3): 259-270, 1996.
- Knies-Bamforth UE, Fox SB, Poulosom R, Evan GI and Harris AL. C-myc interacts with hypoxia to induce angiogenesis *in vivo* by a vascular endothelial growth factor-dependente-mechanism. *Cancer Res*, 64: 6563-6570, 2004.

- Kobayashi H, Ohi H, Sugimura M, Shinohara H, Fujii T and Terao T. Inhibition of *in vitro* ovarian cancer cells invasion by modulation of urokinase-type plasminogen activator and cathepsin B. *Cancer Res*, 52: 3610-3614, 1992.
- Kranenburg O, Kroon-Batenburg LM, Reijerkerk A, Wu YP, Voest EE and Gebbink MF. Recombinant endostatin forms amyloid fibrils that bind and are cytotoxic to murine neuroblastoma cells *in vitro*. *FEBS Lett*, 539 (1-3), 149-155, 2003.
- Kraulis PJ. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plot of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, 24: 946-950, 1991.
- Kreuger J, Matsumoto T, Vanwildemeersch M, Sasaki T, Timpl R, Claesson-Welsh L, Spillmann D and Lindahl U. Role of heparin sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function. *EMBO J*, 21: 6303-6311, 2002.
- Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, Sone S, Ogura T, Matsumoto T, Tachikawa T, Shin S and Ichihara A. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 7071-7075, 1990.
- Kwon M, Caplan JF, Filipenko NR, Choi KS, Fitzpatrick SL, Zhang L and Waisman DM. Identification of annexin II heterotetramer as a plasmin reductase. *J Biol Chem*, 277: 10903-10911, 2002.
- Lavabre-Bertrand T, Henry L, Carillo S, Guiraud I, Ouali A, Dutaud D, Aubry L, Rossi J-F and Bureau JP. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies. *Cancer*, 92 (10): 2493-2500, 2001.
- Lawler JW, Slayter HS & Coligan JE. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem*, 253: 8609-8616, 1978.
- Lee MC, Alpaugh ML, Nguyen M, Deato M, Dishakjian L, Barsky SH. Myoepithelial-specific CD44 shedding is mediated by a putative chymotrypsin-like sheddase. *Biochem Biophys Res Commun*, 279: 116-123, 2000.

- Lee S-J, Jang J-W, Kim Y-M, Lee HI, Jeon JY, Kwon Y-G and Lee S-T. Endostatin bind to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. *FEBS Lett*, 519 (1-3): 147-152, 2002.
- Linding R, Jensen LJ, Diella F, Bork P, Gibson TJ and Russel RB. Protein Disorder Prediction: Implications for structural proteomics. *Structure*, 11: 1453-1459, 2003.
- Liu DL, Wan JX, Tong WC and Bin LH. Inhibition of lung adenocarcinoma LA795 in mice by recombinant human endostatin. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 21 (12): 917-919, 2001.
- Luo B, Cheung HW, Subramanian A, Sharifnia T, Okamoto M, Yang X, Hinkle G, Bohem JS, Beroukhim R, Weir BA, Mermel C, Barbie DA, Award T, Zhou X, Nguyen T, Piquani B, Li C, Golub TR, Meyerson M, Hacohen N, Hahn WC, Lander ES, Sabatini DM and Root DE. Highly parallel identification of essential genes in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (51): 20380-20385, 2008.
- Lyseng-Williamson & Robinson DM. Spotlight on bevacizumab in advanced colorectal cancer, breast cancer, and non-small cell lung cancer. *BioDrugs*, 20 (3): 193-195, 2006.
- Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, 202: 498-499, 1964.
- Madri JA. Extracellular matrix modulation of vascular cell behavior. *Transpl Immunol*, 5: 179-183, 1997.
- Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, Holthaus KA, Hopfer H, Chandamuri BR, Kharbanda S and Kalluri R. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem*, 276: 15240-15248, 2001.
- Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, Ueki K, Kharbanda S, Kahn CR, Sonenberg N, Hynes RO and Kalluri R. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science*, 295(5552): 140-143, 2002.

- Manello F & Gazzanelli G. Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrum, controversies and potential implications. *Apoptosis*, 6 (6): 479-482, 2001.
- Marneros AG & Olsen BR. Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *FASEB J*, 19: 716-728, 2005.
- McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA and Achen MG. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med*, 198: 863-868, 2003.
- Miles LA, Plow EF. Plasminogen receptors: ubiquitous sites for cellular regulation of fibrinolysis. *Fibrinolysis*, 2: 61-71, 1988.
- Moriyasu Y & Malek L. Purification and characterization of the 20S proteasome from the alga *Chara corallina* (*Charophyceae*). *J Physiol*, 40: 333-340, 2004.
- Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW and Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 2811-2816, 1999.
- Nagy JA, Feng D, Vasile E, Wong WH, Shih S-C, Dvorak AM and Dvorak HF. Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Lab Invest*, 86: 767-780, 2006.
- Nesheim M; Wang W; Boffa M, Nagashima, M; Morser, J and Bajzar, L. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost*, 78: 386-391, 1997.
- Noh YH, Matsuda K, Hong YK, Kunstfeld R, Riccard L, Koch M, Oura H, Dadras SS, Streit M and Detmar M. An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human trombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration *in vitro* and tumor growth and angiogenesis *in vivo*. *J Invest Dermatol*, 121: 1536-1543, 2003.
- Novak JF & Trnka F. Proenzyme Therapy of Cancer. 25: 1157-1178, 2005.
- Nyberg P, Heikkilä P, Sorsa T, Luostarinen J, Heljasvaara R, Stenman UH, Pihlajaniemi T and Salo T. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell

- invasion and blocks the activation of matrix metalloprotease-2, -9 and -13. *J Biol Chem*, 2003.
- Nyberg P & Kalluri R. Tumor microenvironment and angiogenesis. *Front Biosci*, 13: 6537-6553, 2008.
- Nyberg P, Ylipalosaari M, Sorsa T and Salo T. Trypsins and their role in carcinoma growth. *Exp Cell Res*, 312 (8): 1219-1228, 2006.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH and Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79: 315-328, 1994.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C and Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med*, 2 (6): 689-692, 1996.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR and Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-287, 1997.
- O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS and Folkman J. Antiangiogenic activity of cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science*, 285: 1926-1928, 1998.
- O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J and Moses MA. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem*, 274: 29568-29571, 1999.
- Obeso J, Werber J and Auerbach R. A Hemangioendothelioma-Derived Cell Line: Its use as a model for the study of endothelial cell biology. *Lab Invest*, 63 (2): 259-69, 1990.
- Ohtani T, Nakamura T, Toda K and Furukawa F. Cyclophosphamide enhances TNF- α -induced apoptotic cell death in murine vascular endothelial cell. *FEBS Lett*, 580 (6): 1597-1600, 2006.
- Ostrowska H, Hempel D, Holub M, Sokolowski J and Kloczko J. Assessment of circulating proteasomes chymotrypsin-like activity in plasma of patients with acute and chronic leukemias. *Clin Biochem*, 41 (16-17): 1377-1383, 2008.

- Overall CM & Blobel C. In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nature Reviews*, 8:245-257, 2007.
- Overall CM, Tam EM, Kappelhoff R, Connor A, Ewart T, Morrison CJ, Puente X, López-Otín C and Seth A. Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. *J Biol Chem*, 385 (6): 493-504, 2004.
- Pacciucci R, Torà M, Díaz VM and Real FX. The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential *in vitro*. *Oncogene*, 16: 625-633, 1998.
- Panka DJ and Mier JW. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells. *J Biol Chem*, 278(39): 37632-37636, 2003.
- Parfyonova YV, Plekhanova OS and Trachuk VA. Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis. *Biochem (Moscow)*, 67: 119-134, 2002.
- Peddinti R, Zeine R, Luca D, Seshadri R, Chlenski A, Cole K, Pawel B, Salwen HR, Maris JM and Cohn SL. Prominente microvascular proliferation in clinically aggressive neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 13 (12): 3499-3506, 2007.
- Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8:21-43, 1997.
- Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L and Vassalli JD. Transforming growth factor- β 1 modulates basic fibroblast growth factor induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells *in vitro*. *J Cell Biol*, 111: 743-55, 1990.
- Pizarro E, Pastén C, Kong M and Morales P. Proteasomal activity in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 69 (1): 87-93, 2004.
- Plank MJ & Sleeman BD. Tumor-induced angiogenesis: a review. *J Theor Med*, 5: 137-153, 2003.

- Posey JA, Khazaeli MB, DelGrosso A, Saleh MN, Lin CY, Huse W and LoBuglio AF. A pilot trial of vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti- $\alpha_v\beta_3$) antibody in patients with metastatic cancer. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 16 (2): 125-132, 2001.
- Pouch MN, Petit F, Buri J, Briand Y and Schmid HP. Identification and initial characterization of a specific proteasome (prosome) associated RNase activity. *J Biol Chem*, 270 (37): 22023-22028, 1995.
- Powers JC, Tanaka T, Harper JW, Minematsu Y, Barker L, Lincoln D, Crumley KV, Fraki JE and Schechter. Mammalian chymotrypsin-like enzymes. Comparative reactivities of rat mast cell proteases, human and dog skin chymases, and human cathepsin G with peptide 4-nitroanilide substrates and with peptide chloromethyl ketone and sulfonyl fluoride inhibitors. *Biochemistry*, 24 (8): 2048-2058, 1985.
- Premzi A, Zavasnik-Bergant V, Turk V and Kos J. Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neo T cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Experim Cell Res*, 283 (2): 206-214, 2003.
- Puente XS, Sánchez LM, Overall CM and López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Rev Genet*, 4: 544-558, 2003.
- Raynal P & Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochem Biophys Acta*, 1197 (1): 193-213, 1994.
- Rehn M & Pihlajaniemi T. $\alpha 1$ (XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91 (10): 4234-4238, 1994.
- Rehn M & Pihlajaniemi T. Identification of three N-terminal ends type XVIII collagen chains and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. The longest form contains a novel motif homologous to rat and *Drosophila* frizzled proteins. *J Biol Chem*, 270 (9): 4705-4711, 1995.

- Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, Nakamura H, Ilmonen M, Lombardo CR, Pihlajaniemi T, Alitalo K and Vuori K. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *PNAS*, 98 (3): 1024-1029, 2001.
- Reijerkerk A, Voest EE and Gebbink MFBG. No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer. *European J Cancer*, 36: 1695-1705, 2000.
- Reinartz J, Schäfer B, Batrla R, Klein CE and Kramer MD. Plasmin abrogates alpha v beta 5-mediated adhesion of a human keratinocyte cell line (HaCaT) to vitronectin. *Exp Cell Res*, 220 (2): 274-282, 1995.
- Rescher U & Gerke V. Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci*, 117: 2631-2639, 2004.
- Reshetnyak YK, Kitson RP, Lu M and Goldfard RH. Conformational and enzymatic changes of 20S proteasomes of rat natural killer cells induced by mono- and divalent cations. *J Struct Biol*, 145: 263-271, 2004.
- Reuning U, Spert S, Kopitz C, Kessler H, Kruger A, Smitt M and Magdolen V. Urokinase type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development and antagonists of uPA/UPAR interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des*, 9 (19): 1529-1543, 2003.
- Reynolds LP, Killilea SD and Redmer DA. Angiogenesis in the female reproductive cycle. *FASEB J*, 6: 886–892, 1992.
- Ribatti D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leukem Res*, 2008.
- Roda O, Valero ML, Peiró S, Andreu D, Real FX and Navarro P. New Insights into the tPA- annexin A2 Interaction. *J Biol Chem*, 278 (8): 5702-5709, 2003.
- Rodriguez-Manzaneque JC, Lana TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J and Iruela-Arispe ML. Trombospondin -1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 12485-12490, 2001.
- Saksela O and Rifkin DB. Cell-associated plasminogen action, regulation and physiological function. *Ann Rev Cell Biol*, 4: 93-126, 1988.

- Sasaki T, Fukai N, Mann K, Göhring W, Olsen BR and Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J*, 17: 4249–4256, 1998.
- Sasaki T, Larson H, Kreuger J, Salmivirta M, Claesson-Welsh L, Lindahl U, Hohenester E and Timpl R. Structural basis and potential role of heparin/heparin sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J*, 18: 6240-6248, 1999.
- Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*, 8: 562-567, 2002.
- Sharp PS. The role of growth factors in the development of diabetic retinopathy, *Metabolismo* 44: 72–75, 1995.
- Sheng S, Truong B, Fredrickson D, Wu R, Pardee AB and Sager R. Tissue-type plasminogen activator is a target of the tumor suppressor gene maspin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 499-504, 1998.
- Shichiri M & Hirata Y. Antiangiogenesis signal by endostatin. *FASEB J*, 15: 1044-1053, 2001.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359: 843-845, 1992.
- Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N and Fidler IJ. Interferons α and β down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 4562-4566, 1995.
- Sinha AA, Wilson MJ, Gleason DF, Reddy PK, Sameni M and Sloane BF. Immunohistochemical localization of cathepsin B in neoplastic human prostate. *Prostate*, 26: 171-178, 1995.
- Sixt SU, Beiderlinden M, Jennissen HP and Peters J. Extracellular proteasome in human alveolar space: a new housekeeping enzyme. *AJP Lung Cell Mol Physiol*, 292: L1280-L1288, 2007.

- Sixt SU & Dahlmann B. Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin-incidence and relevance. *Biochem Biophys Acta*, 1782 (12): 817-823, 2008.
- Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev*, 19: 97-107, 2000.
- Somana A, Mundodi V and Gedamu L. Functional analysis of cathepsin B-like cystein protease from *Leshmania ponovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor- β . *J Biol Chem*, 277: 25305-1, 2002.
- Ständker L, Schrader M, Kanse SM, Jürgens M, Forssmann WG and Preissner KT. Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin. *FEBS Lett*, 420: 129–123, 1997.
- Stoebner PE, Lavabre-Bertrand T, Henry L, Guiraud I, Carillo S, Dandurand M, Joujoux J-M, Bureau J-P and Meunier L. High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma. *British J Dermatol*, 152 (5): 948-953, 2005.
- Sudhakar A, Nyberg P, Keshamaini VG, Mannam AP, Li J, Sugimoto H, Cosgrove D and Kalluri R. Human alpha 1 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by alpha 1 beta 1 integrin. *J Clin Invest*, 115: 2801-2810, 2005.
- Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zisberg M and Kalluri R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (8): 4766-4771, 2003.
- Sugimura M, Kobayashi H and Terao T. Plasmin modulators, aprotinin and anti-catalytic plasmin antibody, efficiently inhibit destruction of bovine vascular endothelial cells by choriocarcinoma cells. *Gynecol Oncol*, 52: 337-346, 1994.
- Sund M, Hamano Y, Sugimoto H, Sudhakar A, Soubasakos M, Yerramalla U, Benjamin LE, Lawler J, Kieran M, Shah A and Kalluri R. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *PNAS*, 102:2934-2939, 2005.

- Sutherland RM. Importance of critical metabolites and cellular interactions in the biology of microregions of tumours. *Cancer*, 58: 1668-1680, 1986.
- Suzuki OT, Sertié AL, Der Kaloustian VM, Kok F, Carpenter M, Murray J, Czeizel AE, Kliemann SE, Rosemberg S, Monteiro M, Olsen BR and Passos-Bueno MR. Molecular analysis of collagen XVIII reveals novel mutations, presence of a third isoform, and possible genetic heterogeneity in Knobloch syndrome. *Am J Hum Genet*, 71(6):1320-1329, 2002.
- Tanaka K, Yoshimura T, Kumatori A, Ichihara A, Ikai A, Nishigai M, Kameyama K and Takagi T. Proteasomes (multi-protease complexes) as 20 S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. *J Biol Chem*, 263: 16209-16217, 1998.
- Tanaka T, Akatsuka S, Ozeki M, Shirase T, Hiai H and Toyokuni S. Redox regulation of annexin 2 and its implications for oxidative stress-induced renal carcinogenesis and metastasis. *Oncogene*, 23 (22): 3980-3989, 2004.
- Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM and Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med*, 6: 460-463, 2000.
- Thurston G. Complementary actions of VEGF and Angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat*, 200 (6): 575-580, 2002.
- Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ and Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have antiangiogenic activity. *J Cell Biol*, 122: 497-511, 1993.
- Tonini T, Rossi F and Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*, 22: 6549-6556, 2003.
- Tressler, RJ; Updyke, TV; Yeatman, T and Nicolson, GL. Extracellular annexin II is associated with divalent cation-dependent tumor cell-endothelial cell adhesion of metastatic RAW117 large-cell lymphoma cells. *J Cell Biochem*, 53 (3): 265-276, 1993.

- Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, Matvjenko O and Holmer L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Biol*, 152: 1247-1254, 2001.
- Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Rev Drug Discov*, 5:785–799, 2006.
- Tuszynski, GP; Sharma, M; Rothman, VL and Sharma, Mc. Angiostatin binds to tyrosine kinase substrate annexin II through the lysine-binding domain in endothelial cells. *Microvasc Res*, 64: 448-462, 2002.
- Vaithilingam IS, McDonald W, Malott DW and Del Maestro RF. An extracellular proteasome-like structure from C6 astrocytoma cells with serine collagenase IV activity and metallo-dependent activity on alpha-casein and beta-insulin. *J Biol Chem*, 270: 4588-4593, 1995.
- Velasco G, Ferrando AA, Puente XS, Sánchez LM and López-Otín C. Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues. *J Biol Chem*, 269: 27136-27142, 1994.
- Vishwanatha JK, Jindal HK and Davis RG. The role of primer recognition proteins in DNA replication: association with nuclear matrix in HeLa cells. *J Cell Sci*, 99: 751-758, 1991.
- Voges D, Zwickl P and Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*, 68: 1015-1068, 1999.
- Von Krüger WM, Lery LM, Soares MR, de Neves-Manta FS, Batista e Silva CM, Neves-Ferreira AG, Perales J and Bisch PM. The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics*, 6 (5): 1495-1511, 2006.
- Wada M, Kosaka M, Saito S, Sano T, Tanaka K and Ichihara A. Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with haematologic malignancy and their pathophysiologic significance. *J Lab Clin Med*, 121: 215-223, 1993.

- Walsh DA. Angiogenesis and arthritis. *Rheumatology*, 38:103–112, 1999.
- Wang H, Schultz R, Hong J, Cundiff DL, Jiang K and Soff GA. Cell surface-Dependent Generation of Angiostatin4.5. *Cancer Research*, 64: 162-168, 2004.
- Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C and Giancotti FG. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage – depended cell growth. *Cell*, 94: 625-634, 1998.
- Wen W, Moses MA, Wiederschain MD, Arbiser JL and Folkman J. Generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Research*, 59: 6052-6056, 1999.
- Wickstrom SA, Alitalo K and Keski-Oja J. An endostatin derived peptide interacts with integrin and regulates actin cytoskeleton and migration of endothelial cells. *J Biol Chem*, 279 (19): 20178-20185, 2004.
- Wickstrom SA, Veikkola T, Rehn M, Pihlajaniemi T, Alitalo K and Keski-Oja J. Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *Cancer Res*, 61 (17): 6511-6516, 2001.
- Wu Y, Zhang Q, Ann DK, Akhondzadeh A, Duong HS, Messadi DV and Le AD. Increased vascular endothelial growth factor may account for elevated level of plasminogen activator inhibitor via activating ERK 1/2 in keloid fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286: C905-C912, 2004.
- Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS and Segal JE. A critical step in metastasis: *in vivo* analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Research*, 60: 2504-2511, 2000.
- Xia H, Zang L, Wen JX and Tong WC. Expression and purification of human endostatin in *Picchia pastoris* and its inhibition on the growth of mouse pulmonary adenocarcinoma cell line LA795. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 22 (5): 393-362, 2002.
- Yeaman TJ, Updyke TV, Kaetzel MA, Dedman JR and Nicolson GL. Expression of annexins on the surfaces of non-metastatic and metastatic human and rodent tumor cells. *Clin Exp Metastasis*, 11: 37-44, 1993.

- Yin G, Liu W, An P, Ding I, Planelles V, Schwarz EM and Min W. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther*, 5: 547-554, 2002.
- Ylikärppä R, Eklund L, Sormunen R, Muona A, Fukai N, Olsen BR and Pihlajaniemi T. Double knockout mice reveal a lack of major functional compensation between collagens XV and XVIII. *Matrix Biol*, 22: 443-448, 2003.
- Zabrenetzky V, Harris CC, Steeg PS and Roberts DD. Expression of the extracellular matrix molecule trombospondin inversely correlate with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 59: 191-195, 1994.
- Zhang L, Luo LM, Xia H, Zhuang LQ, Tong WC and Wen JX. Inhibitory effects of endostatin on interleukin-6 and interleukin-8 release by human umbilical endothelial cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 22 (1): 54-56, 2002.
- Zhang M, Volpert O, Shi YH and Bouck N. Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med*, 6: 196-199, 2000.
- Zoeger A, Blau M, Egerer K, Feist E and Dahlmann B. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clin Chem*, 52 (11): 2079-2086, 2006.
- Zokas L & Glenney Jr JR. The calpactin light chain is tightly linked to the cytoskeletal form of calpactin I: studies using monoclonal antibodies to calpactin subunits. *J Cell Biol*, 105 (5): 2111-2121, 1987.
- Zorick T, Mustacchi Z, Bando SY, M Z, Moreira-Filho CA, Olsen B and Passos-Bueno MR. High serum endostatin levels in patients with Down's syndrome: implication for improved treatment and prevention of solid tumors. *European Journal of Human Genetics*, Holanda, 9 (0): 811-814, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)