



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Análise bioquímica e funcional de uma
metaloprotease PI (BpMPII) isolada da peçonha de
Bothrops pauloensis.**

Aluno: David Collares Achê

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Coorientadora: Dra. Daiana Silva Lopes

Uberlândia – MG

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Análise bioquímica e funcional de uma
metaloprotease PI (BpMPII) isolada da peçonha de
Bothrops pauloensis.**

Aluno: David Collares Achê

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Coorientadora: Dra. Daiana Silva Lopes

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)

UBERLÂNDIA – MG

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A177a Achê, David Collares, 1989-
2013 Análise bioquímica e funcional de uma metaloprotease PI (BpMPII) isolada
da peçonha de *Bothrops pauloensis* / David Collares Achê. -- 2013.
81 p. : il.

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
Co-orientadora: Daiana Silva Lopes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-
Graduação em Genética e Bioquímica

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses. 3. Bothrops - Teses. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Lopes, Daiana Silva. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis*, metaloproteases de peçonha de serpentes, atividades enzimáticas, citotoxicidade.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Análise bioquímica e funcional de uma
metaloprotease PI (BpMPII) isolada da peçonha de
Bothrops pauloensis.**

David Collares Achê

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: _____

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores: Profa. Dra. Márcia Helena Borges

Profa. Dra. Cristiani Baldo da Rocha

Data da Defesa: _____ / _____ / _____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas.

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dedicatória

Dedico esse trabalho ao Grande Criador de todas as coisas, Deus, o único digno de honra. Tudo que fiz e faço é para Glória do Deus altíssimo. “E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.” Romanos 8:28

À minha esposa amada, Patricia Borges Achê, que esteve comigo em todos os momentos. Se alegrando comigo, sendo minha companheira e me sustentando nos momentos difíceis. Glórias a Deus por ter me dado essa mulher sábia que tem edificado nossa casa. Amo você linda, obrigado por tudo. Agradeço a Deus pois, Ele me deu mais do que mereço, mas que sem não poderia viver.

Aos meus pais Jeancarlo Achê e Flávia Achê que me instruíram no caminho correto desde o início e dele não me desviei. Obrigado por terem me dado a base sólida necessária para buscar viver uma vida justa e agradável. Reconheço todo o esforço de vocês e agradeço a Deus por ter me colocado em seus braços.

Amo vocês.

Aos meus irmãos Estevão e Israel e à minha irmãzinha Bianca. Obrigado por fazerem parte dessa construção. Que nossa amizade permaneça assim sempre e que juntos façamos a diferença.

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela dedicação em fazer desse trabalho algo único e relevante e pela preocupação em me fazer melhor profissionalmente. Uma pessoa que se preocupa com seus orientados como se fossem seus filhos. Espero manter essa relação por muitos anos, pois sei que nessa parceria há um enorme potencial para grandes conquistas. Muitíssimo obrigado.

•••

Às professoras Dra. Maria Inês, Dra. Kelly e Dra. Renata por darem as melhores condições para desempenhar um trabalho de qualidade e pelos conselhos que certamente ajudaram e ajudarão muito.

•••

À Msc. Dayane, Dra. Daiana, e Lino pela amizade e ajuda em vários momentos desde o início. São amigos que posso depositar confiança.

•••

Aos colegas do laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais pelo companheirismo.

•••

À Dra. Márcia Helena Borges, Jomara e Daniel Santos pela instrução e ajuda em momentos importantes.

•••

Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica, Marina, Tianinha, Gérsom, Madson e Ismair.

•••

Aos órgãos de fomento FAPEMIG e CAPES.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabela.....	xi
Resumo	12
Abstract.....	14
Apresentação.....	15
Capítulo 1:	16
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1. Enzimas proteolíticas	17
1.2. Metaloproteases	18
1.2.1. Conceito e Classificação	18
1.2.2. Metzincinas	20
1.2.3. Mecanismo de Ativação.....	23
1.3. Metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs – Snake Venom Metalloproteinases)	24
1.3.1. Domínios estruturais de SVMPs.....	25
1.3.2. Classificação das SVMPs.....	27
1.4. Composição da peçonha de <i>B. pauloensis</i> : Origem das SVMPs	29
1.4.1 Ação das SVMPs: Hemostasia e Efeitos sobre células.....	32
2.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
Capítulo 2:	45
Resumo	47
Abstract.....	49
1.0. INTRODUÇÃO	50

2.0	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1.	Peçonha e animais	52
2.2.	Reagentes para eletroforese, cromatografia, seqüenciamento, ensaios enzimáticos e biológicos	52
2.3.	Cultura de células	53
2.4.	Isolamento da metaloprotease BpMP II	53
2.4.1.	Cromatografia CM-sepharose <i>Fast Flow</i>	53
2.4.2.	Cromatografia em gel de filtração Sephacryl S300	53
2.4.3.	Cromatografia de troca iônica em Capto-Q	54
2.4.4.	Cromatografia de alta eficiência em modo fase reversa (HPLCRP)	54
2.5.	Dosagem de proteínas.....	54
2.6.	Caracterização bioquímica	55
2.6.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)	55
2.6.2.	Determinação da massa molecular por MALDI-TOF	56
2.6.3.	Focalização Isoelétrica	56
2.7.	Caracterização Estrutural	57
2.7.1.	Determinação da sequência	57
2.8.	Caracterização Enzimática	58
2.8.1.	Atividade proteolítica sobre a Azocaseína	58
2.8.2.	Atividade Fibrinogenolítica	59
2.8.3.	Atividade Hemorrágica.....	59
2.8.4	Atividade Miotóxica por dosagem de Creatina Cinase (CK)	60
2.8.5.	Viabilidade celular	60
2.9.	Análise Estatística.....	61
3.0.	RESULTADOS	61
3.1.	Isolamento e caracterização bioquímica da BpMP II	61

3.1.2 Sequênciamento parcial da BpMPII por MS/MS	66
3.2 Caracterização enzimática e bioquímica	66
3.2.1 Atividade Fibrinogenolítica.....	68
3.3 Caracterização Biológica	69
3.3.1 Teste de citotoxicidade por MTT.....	69
3.3.2. Teste de miotoxicidade por dosagem de Creatina Cinase (CK)	71
4.0. DISCUSSÃO.....	71
5.0. CONCLUSÃO	76
6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Esquema de classificação das enzimas proteolíticas.....	14
Figura 2. Esquema de classificação das metaloproteases de acordo com o motivo de ligação do zinco	16
Figura 3. Esquema de divisão dos clãs pertencentes à tribo das Zincinas.....	16
Figura 4. Representação esquemática da estrutura do sítio ativo das metaloproteases das famílias matrixinas e adamalisinas.....	17
Figura 5. Topografia das ADAMs e metaloproteases relacionadas.....	19
Figura 6. Modelo de zimogênio.....	21
Figura 7. Esquema de classificação das SVMPs.....	25
Figura 8. Distribuição geográfica e padrão de manchas da espécie <i>B. pauloensis</i>	27
Figura 9. Perfil transcriptômico da glândula de peçonha da serpente <i>B. pauloensis</i>	28

Capítulo 2

Figura 1. Perfil cromatográfico da peçonha bruta e eletroforese em gel com os picos obtidos.....	59
Figura 2. Perfil cromatográfico da fração CM1 em coluna de gel filtração Sephacryl S300 e eletroforese em gel com os picos obtidos.....	60

Figura 3. Perfil cromatográfico da fração CM1S3 em coluna de troca-iônica Capt	61
Q e eletroforese em gel do pico majoritário.....	
Figura 4. Perfil cromatográfico da BpMP-II submetida à RP-HPLC.....	62
Figura 5. Perfil da espectrometria de massa da BpMP-II por MALDI-TOF.....	62
Figura 6. Espectro do perfil de massas dos peptídeos obtidos a partir da fragmentação da proteína BpMP-II com tripsina.....	64
Figura 7. Histograma com score de similaridade de BpMP-II com outras SVMPs.....	64
Figura 8. Alinhamento da sequência parcial da BpMP-II com outras SVMPs.....	65
Figura 9. Atividade proteolítica da BpMP-II sobre a azocaseína – Dose-dependente.....	66
Figura 10. Atividade azocasenolítica da enzima BpMP-II – temperatura-dependente.....	67
Figura 11. Atividade proteolítica de BpMP-II sobre a azocaseína em soluções de diferentes pHs.....	67
Figura 12. Atividade fibrinogenolítica em diferentes condições experimentais....	69
Figura 13. Gráfico de viabilidade celular de células tEnd quando incubadas com diferentes concentrações de BpMP-II e de BpMP-I.....	70
Figura 14. Gráfico da dosagem de creatina cinase.....	71

Lista de Tabela

Capítulo 1

Tabela 1. Rendimento proteico e atividade enzimática das frações e da BpMP-II.....	63
--	----

Resumo

Proteases são enzimas abundantemente encontradas em todos os cinco grandes reinos de seres vivos. Essas enzimas proteolíticas provenientes da natureza têm sido alvos de estudos com a finalidade de buscar ferramentas de uso terapêutico por atuarem em diversos processos fisiopatológicos. Metaloproteases são enzimas proteolíticas da classe das hidrolases que dependem da ligação de um metal em seu sítio ativo (geralmente o zinco) para exercer suas atividades. Essas enzimas participam de diversos eventos fisiológicos e patológicos. As metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMPs) estão entre as toxinas animais mais estudadas. Elas são divididas em classes (PI, PII e PIII) de acordo com a composição estrutural e a presença de domínios. As metaloproteases da classe PI contêm um pró-domínio e o domínio catalítico em sua estrutura. No presente trabalho, nós descrevemos as características bioquímicas e funcionais de uma metaloprotease da classe PI denominada *Bothrops pauloensis* Metalloproteinase-II (BpMP-II), isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*. BpMP-II foi purificada utilizando-se três passos cromatográficos em resinas de troca catiônica CM-Sepharose *Fast Flow*, coluna de gel filtração Sephadryl S-300 e resina de troca aniônica HisTrap Capto-Q. A enzima isolada apresentou-se homogênea em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras e não-redutoras, com uma massa molecular de 23kDa determinada por espectrometria de massas MALDI-TOF. O ensaio de focalização isoelétrica resultou em um pl levemente ácido de 6,1 para a BpMP-II. A sequência parcial da proteína determinada por MS/MS (MALDI – TOF/TOF) apresentou alta similaridade estrutural com outras SVMPs com score bastante significativo. BpMP-II mostrou alta atividade proteolítica sobre azocaseína sob diferentes condições experimentais e sobre o fibrinogênio bovino com variação de dose, pH. BpMP-II foi inibida por EDTA, 1,10 fenantrolina (agentes quelantes) e β-mercaptoetanol (agente redutor ligação S-S). Além disso, esta protease apresentou estabilidade em pH neutro ou alcalino e foi inativada em temperaturas elevadas (60°C). BpMP-II mostrou ser citotóxica para células tEnd em concentrações acima de 20µg/µL. Um leve aumento nos níveis de creatina quinase (CK) foi observado quando injetada

intramuscularmente em camundongos. Assim, o presente trabalho permitiu identificar e caracterizar uma molécula com grande potencial de aplicação terapêutica.

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis*, metaloproteases de peçonha de serpentes, atividades enzimáticas, citotoxicidade.

Abstract

Proteases are enzymes widely found in all five life being kingdoms. These proteolytic enzymes have been studied and can be used as therapeutic tools due to their actions on physiopathologic events. Metalloproteinase are hydrolytic zinc-binding dependent enzymes which interfere in physiological processes. Snake venom metalloproteinase are widely studied animal toxins. They are divided into classes (PI, PII and PIII) and PI metalloproteinase are composed of a pro-domain and a catalytic domain in its structure. In the present work, we demonstrated the biochemical and functional characteristics of a PI- metalloproteinase (BpMP-II) isolated from *B. pauloensis* venom. BpMP-II was purified in three chromatography steps on cation exchange resin CM-Sepharose Fast flow, filtration Sephadryl S-300 and anion exchange Capto-Q. The isolated enzyme was homogeneous on SDS-PAGE under reduction and non-reduction conditions, with a molecular weight of 23kDa determined by MALDI-TOF mass spectrometry. The isoelectric focalization demonstrated a slight acid pI (6,1) of BpMP-II. The partial sequence of protein was determined by MS/MS (MALDI-TOF/TOF) and showed high structural similarity with others SVMPs as well as a significant score match. BpMP-II showed high proteolytic activity upon azocasein and bovine fibrinogen and was inhibited by EDTA, 1,10 phenanthroline and β -mercaptoethanol. Moreover, this enzyme showed stability at neutral and alkaline pH and it was inactivated at temperatures higher than 60°C. Concentrations higher than 20 μ g of BpMP-II was able to decrease tEnd cells viability. A slight increase in creatine kinase (CK) levels was noticed when BpMP-II was administrated an intramuscular route on mice. Therefore, the present work permitted the identification and characterization of a molecule with great therapeutic potential.

Key Words: *Bothrops pauloensis*, Snake venom metalloproteinase, enzymatic activity, citotoxicity.

Apresentação

Diversos processos fisiológicos e também patológicos são mediados por enzimas proteolíticas que recebem o nome de peptidases ou endopeptidases. Processos regulatórios importantes para manutenção da vida como digestão, reparo tecidual e coagulação sanguínea são exemplos de eventos nos quais essas enzimas proteolíticas atuam.

Peçonhas de serpentes contêm enzimas proteolíticas que desempenham papéis importantes no envenenamento. As metaloproteases são exemplos de complexos com ação enzimática que, por ação individual ou sinérgica, podem provocar resposta inflamatória, necrose tecidual assim como alterações profundas no sistema hemostático.

Metaloproteases são endopeptidases que apresentam um íon metálico em seu sítio ativo. São compostas por domínios funcionais específicos que servem de critério para classificação das classes de metaloproteases de peçonha de serpentes. No presente trabalho foi isolada uma metaloprotease da peçonha de *Bothrops pauloensis* (jararaca pintada) denominada BpMP-II e foram determinadas suas propriedades enzimáticas, estruturais e biológicas. Esses estudos permitem compreender melhor os compostos dessa natureza e podem contribuir para que a pesquisa básica se torne pesquisa aplicada. O desenvolvimento de fármacos é o objetivo de estudos dessa natureza.

A dissertação deste trabalho foi realizada seguindo as normas do curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia-MG e da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT, sendo dividida em dois capítulos. O CAPÍTULO 1 – Introdução geral ou revisão bibliográfica caracterizando enzimas proteolíticas, conceituando e classificando metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs) e definindo componentes presentes em peçonhas botrópicas. O CAPÍTULO 2 – apresenta o trabalho intitulado: Caracterização bioquímica e funcional de uma nova metaloprotease (BpMP-II) isolada de peçonha de *Bothrops pauloensis* (*artigo em preparação*).

Capítulo 1:

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas ou peptidases são essenciais à vida, pois participam de vários processos fisiológicos e patológicos tais como a digestão, remodelamento e reabsorção de tecido, degradação de proteínas intracelulares, entre outros. As enzimas proteolíticas eram classificadas de acordo com sua especificidade pelo substrato, carga e massa molecular. Atualmente, a classificação das peptidases é baseada na comparação do mecanismo catalítico, nos resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise e na estrutura tridimensional da proteína. Com base nessa classificação essas enzimas são distribuídas em seis grupos (**Figura 1**): serinoproteases, cisteinoproteases, aspartilproteases, treoninoproteases, glutamilproteases, metaloproteases e ainda encontram-se aquelas cujos resíduos envolvidos na catálise são desconhecidos (BARRETT *et al.*, 1998; RAWLINGS *et al.*, 2008).

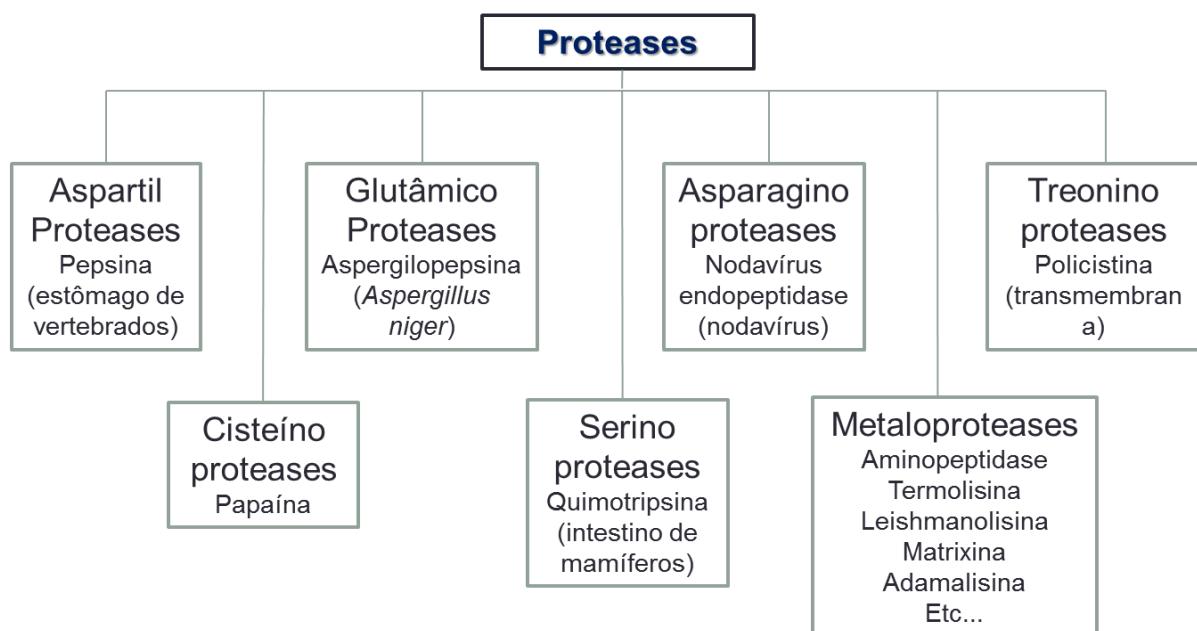


Figura 1: Esquema de classificação das enzimas proteolíticas. FONTE: Adaptado de Rawlings *et al.* 2008.

1.2. Metaloproteases

1.2.1. Conceito e Classificação

Metaloproteases ou metaloendopeptidases (MP) são enzimas hidrolíticas classificadas como endopeptidases (E.C.3.4.24) e dependem da ligação de um metal (zinco, cobalto, níquel ou manganês) em seu sítio catalítico para exercerem suas atividades. Estas atingem um alto nível de abrangência em processos fisiológicos e patológicos importantes como adesão celular, fertilização, transdução de sinais, reparo da matriz, câncer, processos aterotrombóticos, intoxicação por animais peçonhentos, etc.

Essas enzimas são amplamente distribuídas desde bactérias até mamíferos e estão divididas em quatro níveis hierárquicos (Classe, Tribo, Clã e Famílias) de acordo com similaridades estruturais do motivo de ligação do zinco, sítio de ligação do substrato e motivos envolvidos na catálise (GOMIS-RÜTH *et al.* 2003; GOMIS-RÜTH *et al.* 2012) (**Figura 2**).

A classe das metaloproteases zinco dependentes é subdividida em quatro tribos: 1- Zincinas: contém a sequência conservada HEXXH, como motivo de ligação ao zinco; 2- Inverzincinas: possuem o domínio Zincina invertido (HXXEH) de ligação ao zinco; 3- Carboxipeptidase: possuem o motivo de ligação ao zinco, HXXE; e 4- DD-carboxipeptidase: apresentam o motivo de ligação ao zinco HXH. Para ligação ao metal, todos os grupos possuem como 1º e 2º ligantes resíduos de histidina, exceto as carboxipeptidases. Já o terceiro ligante pode ser um resíduo de histidina (exceto nas inverzincinas) ou um ácido glutâmico (zincinas e inverzincinas).

O maior grupo é representado pelas Zincinas, subdividido em Clãs denominados Gluzincinas (aqueles em que o terceiro ligante do zinco é o ácido glutâmico) Aspzincinas (aqueles cujo aspartato é o terceiro ligante do zinco), S2P-zincinas (cujo terceiro ligante é histidina ou aspartato) e Metzincinas (cujo terceiro ligante do zinco é uma histidina ou aspartato). Esse último compreende nove famílias como esquematizado na **Figura 3**.

Hierarchy level

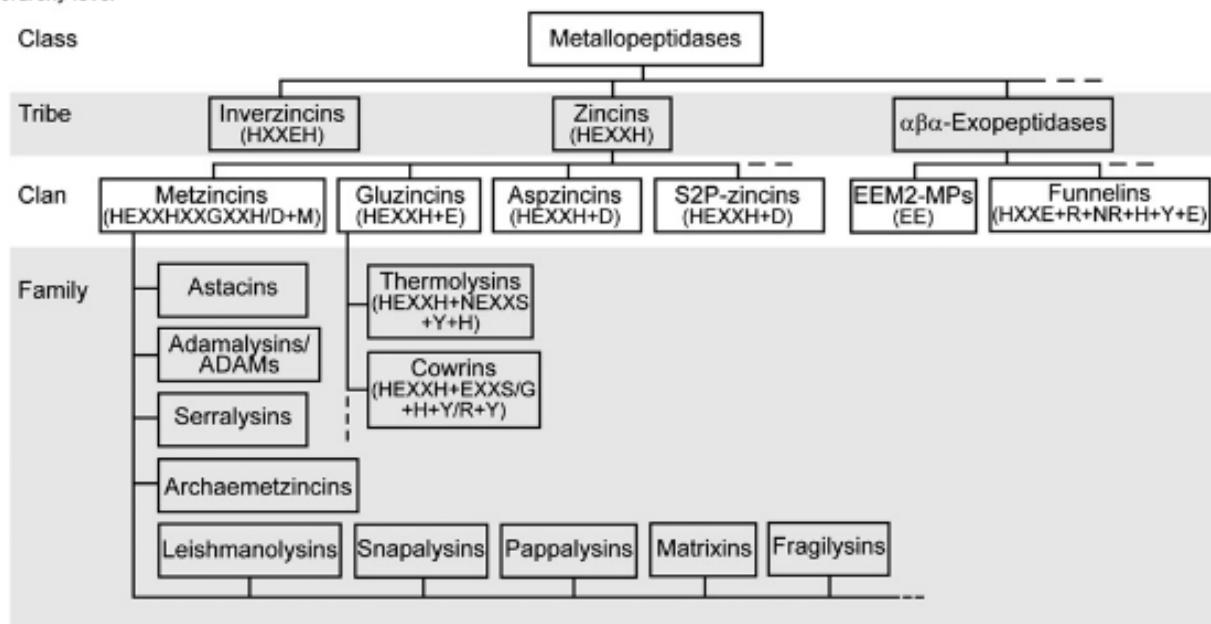


Figura 2 – Esquema de classificação das metaloproteases de acordo com o motivo de ligação do zinco. O grupo das Zincinas é subdividido em Gluzincinas, Metzincinas, Aspzincinas e S2P-zincinas (Gomis-Rüth *et al.*, 2012).

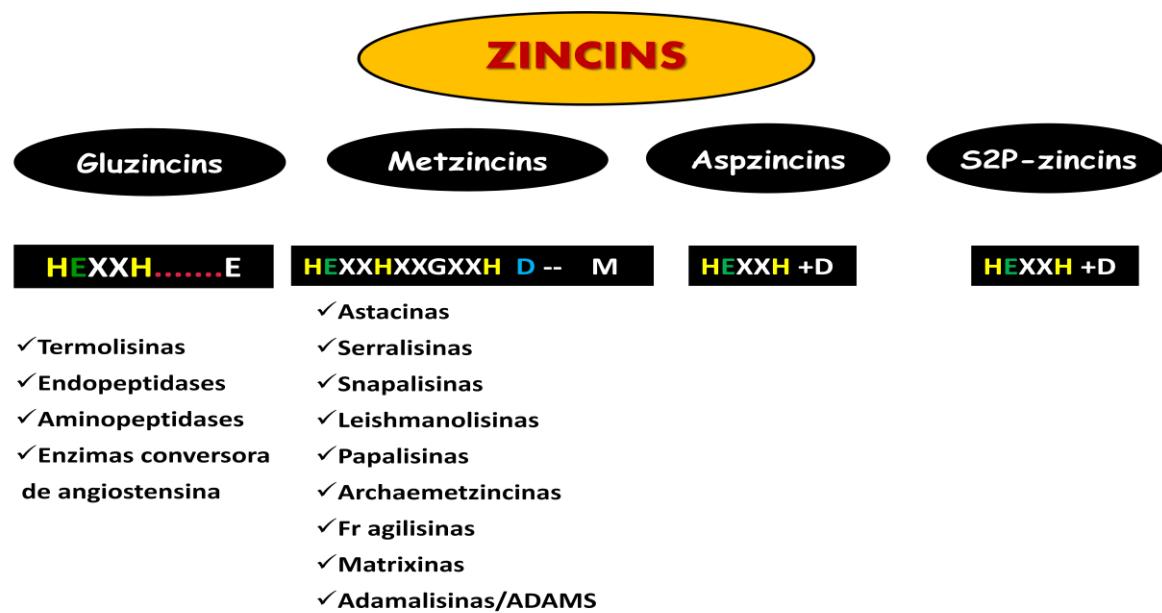


Figura 3 – Esquema de divisão dos clãs pertencentes à tribo das Zincinas. Detalhamento das famílias pertencentes ao grupo das Metzincinas.

1.2.2. Metzincinas

As metaloproteases do clã Metzincinas são subdivididas nas famílias Astacinas (M12A) (encontradas em crustáceos), Serralisinas (M10B) (encontradas em bactérias), Matrixinas (MMPs) (M10A) encontradas na matriz extracelular de mamíferos, Leishmanolisinas, Pappalisinas e as Adamalisinas (M12B) (BODE et al, 1993; HOOPER, 1994; STOCKER et al, 1995; MATSUI et al, 2000; FOX; SERRANO, 2005; WANG et al, 2005; GOMIS-RUTH, 2009).

As metaloproteases das famílias Matrixinas M10A e Adamalisinas M12B (de acordo com classificação do banco de proteases MEROPS; <http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>) são dependentes de zinco e apresentam uma sequência consenso estendida comum aos diferentes membros desta família de metaloproteases, H-E-B-X-H-X-B-G-B-X-H.....M, em que H é uma histidina, E é o ácido glutâmico, G é a glicina, B é qualquer resíduo hidrofóbico, X é qualquer aminoácido além de possuir um resíduo de metionina em comum, distante do *motif* de ligação do átomo de zinco, na volta abaixo do sítio ativo (*met-turn*) e um segmento em hélice carboxi-terminal, contendo três resíduos de histidina que estão envolvidos no sítio de ligação do zinco (**Figura 4**).

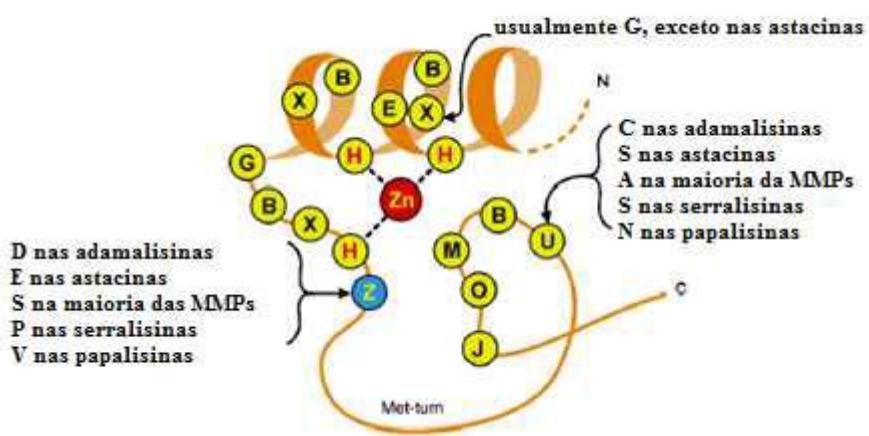


Figura 4 - Representação esquemática da estrutura do sítio ativo das metaloproteases das famílias matrixinas e adamalisinas (STOCKER e BODE, 1995; FOWKKES et al., 2002)

As metaloproteases de matriz ou MMPs (MEROPS M10A) são proteases secretadas ou ligadas à membrana identificadas há 40 anos como a protease responsável pela metamorfose dos anuros. Essas enzimas podem ser classificadas em collagenases verdadeiras, gelatinases e estromalisina (GOMIS-RÜTH, 2009).

As MMPs estão envolvidas em vários processos homeostáticos importantes, como na implantação do blastocisto, ovulação, reparo tecidual e outros. Entretanto, esse alto potencial proteolítico ou a ausência desse potencial podem acarretar eventos patológicos que incluem inflamação; úlceras gástricas, epiteliais e das córneas; artrite reumatóide; periodontite; infarto cardíaco; fibrose renal, hepática e pulmonar e angiogênese, invasão e metástase tumoral. Processos como inflamação e isquemia envolvem a participação de moléculas efetoras da matrix extracelular como colágeno, fibrinogênio e MMPs. Além do papel do reparo tecidual, as metaloproteases de matriz têm se mostrado importantes em eventos mais “sofisticados”. Estão relacionadas a processamentos proteolíticos, como a ativação ou inativação de proteólise limitada observadas na apoptose, ativação da proteína defensora intestinal e patologias do sistema nervoso (GOMIS-RÜTH, 2003).

Como em outras famílias, as MMPs são proteínas constituídas por uma série de insertos e domínios. Inclui basicamente o peptídeo-sinal de aproximadamente 20 resíduos de aminoácidos, o domínio pró-peptídico com 80 resíduos, um domínio catalítico zinco ou cálcio dependente que apresenta de 160 a 170 resíduos de aminoácidos, uma região ligante e um domínio C-terminal tipo hemopexina. Demais inserções podem variar a composição das MMPs (domínio fibronectina tipo II, inserção tipo vitronectina, etc.) (**Figura 5**).

A família das Adamalisinas, também conhecidas como Reprolisinhas, é composta por proteínas que apresentam alguns domínios homólogos entre si, como o domínio catalítico, o tipo desintegrina e o rico em cisteína, e é composta pelas ADAMs (**A Disintegrins And Metalloproteinase**), as ADAMTSs (**A Disintegrin And Metalloproteinase with Trombospondin-like**) que são expressas em mamíferos, e as metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) (**Figura 5**).

As ADAMs formam uma família de proteinases transmembrânicas, de estrutura modular caracterizada pela presença dos domínios catalíticos,

desintegrina, rico em cisteína, EGF (fator de crescimento epidérmico), transmembrânico e citoplasmático (**Figura 5**). Esta família pertence ao grupo das proteínas de superfície celular que podem ter atividade de adesão, como moléculas de superfície celular, e atividade proteolítica (WOLFSBERG e WHITE, 1996). Estas proteases desempenham importante papel fisiológico em processos de inflamação, mitogênese, angiogênese, reprodução, proteólise, adesão e sinalização (ANDREWS e BERNDT, 2000). Modulam também processos biológicos como a migração e o crescimento celular (ALFANDARI *et al.* *et al.*, 2001).

As ADAMTs são proteases formadas pelos domínios prodomínio, catalítico, desintegrina-like, trombospondina (TSP) tipo I, rico em cisteína, região espaçadora, e um número variável de *submotifs* na região C-terminal (**Figura 5**). Essas proteases apresentam diversas atividades biológicas, tais como o processamento do pró-colágeno (N-proteinase), degradação de proteoglicanos da matriz, inibição da angiogênese, coagulação sanguínea, fertilidade e inflamação (POTER *et al.* *et al.*, 2005).

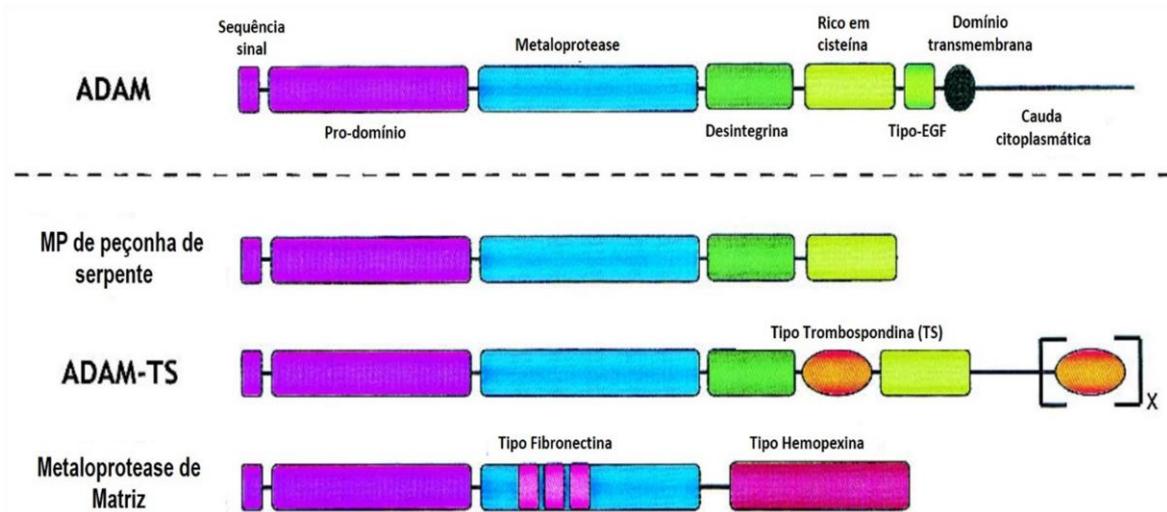


Figura 5: Topografia das ADAMs e metaloproteases relacionadas. Principais domínios estruturais das ADAMs, ADAMTs, SVMP e MMP são demonstrados. Note a ausência de domínio desintegrina nas Metaloproteases de Matriz (MMP) e a presença do domínio tipo Trombospondina nas ADAMTs (adaptado de SEALS e COURTNEIDGE, 2003).

1.2.3. Mecanismo de Ativação

As metaloproteases são sintetizadas e secretadas como pró-enzimas inativas (zimogênios). Estas enzimas possuem uma sequência consenso conservada, P-R-C-G-(V/N)-P-D e P-K-M-C-G-V-T, nas Matrixinas e Adamalisinas respectivamente, que se encontram no pró-domínio, localizada cerca de vinte posições antes do resíduo N-terminal do domínio catalítico. O grupo tiol de uma cisteína presente nessa sequência se liga ao zinco do sítio catalítico inibindo a função proteolítica da enzima; mecanismo esse conhecido como *Cysteine-switch*. Elas são ativadas geralmente por hidrólise do pró-domínio. O domínio catalítico da protease é representado pelo zinco catalítico ligado por três resíduos de histidina presentes na sequência de consenso HEXXHXXGXXH formando um sítio ativo em hélice. Todas as hidrolases zinco-dependentes na forma ativa possuem uma molécula de água como um quarto ligante que é essencial para a catálise. A porção N-terminal da protease madura começa na alça à esquerda da molécula (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006) (**Figura 6**).

A interrupção da interação cisteína-zinco causa ativação da molécula. A ativação fisiológica das metaloproteases é provavelmente iniciada por proteases que clivam sítios específicos dentro do pró-peptídeo, mas a ativação final das metaloproteases para a forma madura requer a retirada do pró-peptídeo inteiro por um mecanismo de autólise (MATRISIAN, 1992; GRAMS *et al.*, 1993). Entende-se também, que a liberação do sítio ligante de zinco pode ser resultado da ação de metaloproteases endógenas, além de também poderem ser ativadas por agentes oxidantes, surfactantes, metais pesados, entre outros, que modificam o resíduo de cisteína e dessa forma promovem a desestabilização da ligação do zinco com o grupo tiol da cisteína ativando a enzima (SPRINGMAN *et al.*, 1990).

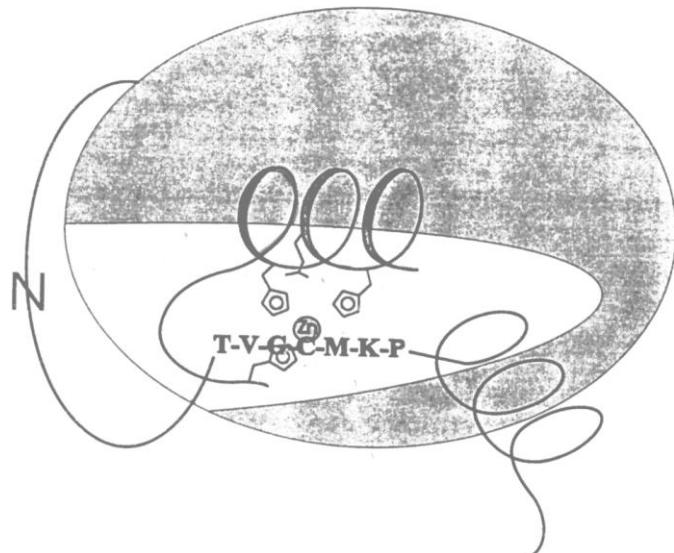


Figura 6: Modelo de zimogênio em que a região N-terminal é alongada por um pró-peptídeo que possui a sequência PKM**C**GV, onde o grupo tiol de uma cisteína se liga ao zinco do sítio ativo (GRAMS *et al.*, 1993).

1.3. Metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases*)

As metaloproteases da peçonha de serpentes (SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases*) são proteínas zinco dependentes e apresentam massa molecular que variam de 20 a 110 kDa. Há uma grande homologia no domínio metaloprotease dessas enzimas, e em alguns casos até nos domínios da porção carboxi-terminal (FOX; SERRANO, 2008). Estudos proteômicos e transcriptônicos revelaram que dentre as toxinas com alta atividade enzimática, as metaloproteases são as mais expressas em serpentes da família Viperidae, compreendendo no mínimo 30% do total das proteínas presentes nas peçonhas (RODRIGUES *et al.*, 2012; KOHLHOFF, *et al.*, 2012). Estas são responsáveis principalmente pela indução de hemorragia local e sistêmica que ocorre no envenenamento (FOX; SERRANO, 2008). As SVMPs também atuam interrompendo a hemostasia via mediadores pró-coagulantes e anticoagulantes, agregação plaquetária, atividades apoptóticas e pró-inflamatórias (GUTIERREZ *et al.*, 2005).

De modo geral, o mecanismo de ação das SVMPs está relacionado à proteólise de componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina) (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005), proteínas plasmáticas (fibrinogênio, fibrina, fator de Von Willenbrand, protrombina) (SILVA *et al.*, 2003); proteínas de membrana celular (integrinas e caderinas) (KAMIGUTI *et al.*, 2003) e à interação

com receptores específicos, como por exemplo integrinas de superfície de plaquetas, receptores de células endoteliais e fibroblastos, ativando ou inibindo a resposta celular (WHITE, 2005; MOURA-DASILVA *et al.*, 2007; DE LUCA *et al.*, 1995; YOU *et al.*, 2006). Esses efeitos podem resultar em várias alterações fisiopatológicas tais como inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e hemorragia (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005). Recentes estudos cristalográficos de SVMPs de alto massa molecular das filogeneticamente relacionadas ADAMs e ADAMTSs têm elucidado as propriedades da relação estrutura-função da classe das metaloproteases (MALEMUD, *et al.* 2006)

1.3.1. Domínios estruturais de SVMPs

As SVMPs são sintetizadas como pró-enzimas inativas e apresentam diversos domínios que desempenham funções que as auxiliam no direcionamento, inativação e toxicidade (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; FOX; SERRANO, 2008). Os domínios presentes nas metaloproteases são os seguintes: peptídeo sinal, pró-domínio, metaloprotease, interdomínio e dependendo da classe podem conter também domínios desintegrina ou tipo desintegrina, rico em cisteína e domínio tipo lectina-C.

O peptídeo sinal é constituído por uma sequência de 18 aminoácidos, a maior parte hidrofólicos, este direciona a proteína sintetizada no retículo endoplasmático (FOX; SERRANO 2008). O pró-domínio é composto por 200 resíduos de aminoácidos extremamente conservados nas SVMPs. Essa região é responsável por modular a atividade enzimática desse grupo através do mecanismo de *cysteine-switch* (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

O domínio metaloprotease ou catalítico apresenta uma sequência de 200 a 210 resíduos de aminoácidos. Nesse domínio está presente o motivo ligante de zinco, HEXXHXXGXXH, e a sequência CIMXP onde se encontra o resíduo de metionina na posição 166 (*met-turn*) que é o responsável por manter a estabilidade da estrutura favorecendo a ligação do zinco (FOX; SERRANO, 2005; RAMOS; SELISTRE, 2006). A catálise enzimática das SVMPs, revelada por estudos estruturais, demonstrou que a presença de uma molécula de água localizada entre o grupo carboxílico do Glu335 catalítico e o íon zinco provoca

um aumento da polarização na região do sítio catalítico, isto possibilita a transferência de um próton da molécula de água para o Glu335, o qual se torna um nucleófilo e ataca o grupo carbonil da ligação peptídica do substrato levando o íon zinco a um estado de transição penta-coordenado. Com a transferência do próton do Glu para o nitrogênio da ligação peptídica do substrato, o mesmo é clivado liberando os subprodutos da reação, a enzima é regenerada com a incorporação de uma nova molécula de água (STOCKER *et al.*, 1995; RAMOS; SELISTRE, 2006).

O interdomínio é um segmento com 13 a 15 resíduos de aminoácidos que se encontra entre os domínios metaloprotease e desintegrina ou tipo desintegrina. Em algumas SVMPs esse segmento apresenta um resíduo de cisteína que participa da formação de uma ponte dissulfeto com o domínio adjacente, e atua contra o processamento proteolítico (FOX; SERRANO, 2005; RAMOS; SELISTRE-DEARAUJO, 2006).

O domínio desintegrina e tipo desintegrina apresentam de 41 a 100 resíduos de aminoácidos e contém pontes de dissulfeto em sua estrutura (Figura 7B) (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006). As desintegrinas e as proteínas similares presentes nas peçonhas de serpentes são provenientes do processamento proteolítico de metaloproteases específicas, e apresentam alto potencial farmacológico por inibir a interação integrinas-ligante (KINI; EVANS, 1992). As desintegrinas encontradas nas peçonhas de serpentes podem apresentar diferentes motivos que interagem com diferentes tipos de integrinas. Integrinas são proteínas transmembrânicas heterodiméricas constituídas por uma subunidade α e β. Essas subunidades formam um receptor que facilita o ancoramento da célula com proteínas da matriz extracelular como o colágeno e fibronectina (WEGENER E CAMPBELL, 2008).

O domínio rico em cisteína é formando por 112 resíduos de aminoácidos, e nas SVMPs está localizada na porção C-terminal do domínio desintegrina. Esse domínio pode estar envolvido no caráter hemorrágico e na atividade sobre a fusão e adesão celular.

O domínio semelhante à lectina tipo-C são domínios encontrados em dois membros das metaloproteases – RVV-X (ativador do fator X, proveniente da peçonha de *Daboia russelii*) e VLFXA (ativador do fator X de *Vipera lebetina*).

1.3.2. Classificação das SVMPs

A partir de 1990, com a determinação das primeiras sequências de cDNA de algumas metaloproteases foi possível realizar uma classificação estrutural detalhada (FOX e SERRANO, 2009). Essencialmente observaram-se diferenças de tamanho entre elas e a presença de diferentes domínios estruturais (BJARNASON e FOX, 1995). As metaloproteases de venenos foram então organizadas de acordo com seus domínios estruturais em quatro classes: P-I, P-II, P-III e P-IV de acordo com a sequência de seus aminoácidos e N-I a N-IV baseando-se nas sequências de seus cDNAs (BJARNASON e FOX, 1995).

Com advento de metodologias proteômicas e transcriptômicas, novas sequências de metaloproteases foram obtidas. Assim, Fox e Serrano em 2008 propuseram uma reclassificação das SVMPs, onde 11 subclasses foram descritas: Pla, PIIa, PIIb, PIIc, PIId, PIle, D-I, PIIIa, PIIIb, PIIIc e PIID. O critério utilizado para classificar as SVMPs foi essencialmente baseado nas características dos precursores das metaloproteases de peçonha, bem como nos produtos gerados a partir desses precursores após modificações pós-traducionais durante o processo de síntese.

As SVMPs da classe PI são as mais simples das metaloproteases de serpentes e compreende proteínas que apresentam apenas o domínio catalítico na forma madura, mas com domínio peptídeo sinal e o pró-domínio antes da proteólise, com massa molecular de 20 a 30 kDa e pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. Membros da classe PII apresentam massas moleculares de 30-60 kDa e têm um domínio desintegrina presente na forma nativa além do domínio metaloprotease. O domínio desintegrina, na maioria das vezes, é processado pós-traducionalmente a partir do domínio proteinase, gerando a porção não enzimática com forte atividade inibitória sobre a agregação plaquetária (McLANE *et al.*, 1998; McLANE *et al.*, 2004; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; JUAREZ *et al.*, 2008). As metaloproteases da classe PIII apresentam alta atividade hemorrágica e massa molecular de 60 a 80 kDa. Essas proteases são distintas por apresentarem domínios adicionais no C-terminal chamados de desintegrina-*like* e domínios ricos em cisteína que podem ou não serem

liberados de formas precursores (FOX e SERRANO, 2008). A classe PIII é dividida em subclasses de acordo com modificações pós-traducionais como dimerização (PIIIC) ou processamento proteolítico (PIIIB). A subclasse das SVMPs heterotrimérica, antes chamada PIV, foi incluída no grupo PIII, mais especificamente na subclasse PIIID.

Nesta classificação a classe P-IV foi incorporada na classe P-IIId, considerando-se que até agora nenhum precursor específico contendo todos os domínios presentes nessas proteases foi descrito. Isso indica que as proteases com essa estrutura são formadas por modificações pós-traducionais de um precursor da classe P-III (FOX e SERRANO, 2008) (**Figura 7**).

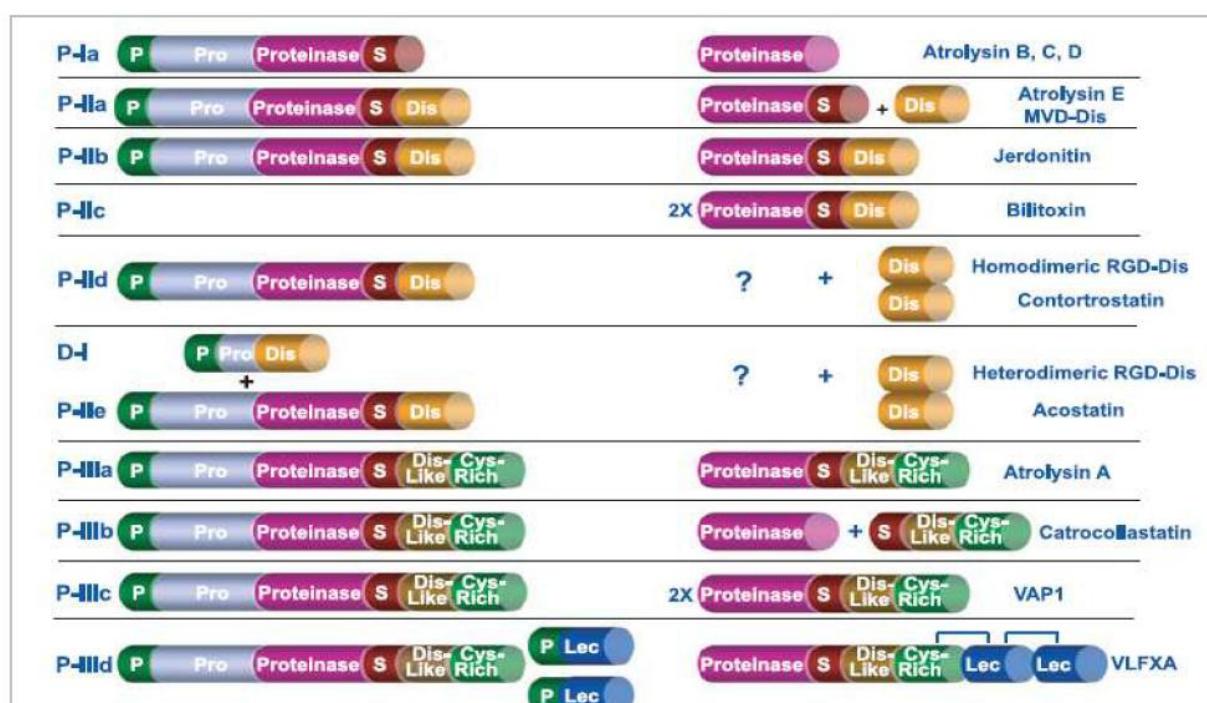


Figura 7: Esquema de classificação das SVMPs de acordo com Fox e Serrano (2008). Classes e subclasses das Metaloproteases de peçonhas de serpentes segundo domínios estruturais.

Portanto, conforme essa ultima classificação representada na figura 6, as metaloproteases de peçonha de serpentes estão classificadas de acordo com seus diferentes domínios estruturais como se segue: classe P-I (SVMPs que possuem apenas o domínio metaloprotease); PIla a PIle (possuem o domínio metaloprotease e domínios desintegrina; podem estar presentes como dímeros

ou somente como dímeros de desintegrina). PIIIa a PIIIC (contém o domínio metaloprotease, desintegrina-like e domínio rico em cisteínas, podem também formar dímeros) e finalmente PIID, anteriormente conhecida como PIV (contém a estrutura de PIII e 2 domínios lectina tipo-C conectados por ligações dissulfeto) (FOX;SERRANO, 2008).

Assim, a biossíntese dos venenos de serpentes ocorre nas glândulas especializadas, onde a maioria das proteínas secretadas é sintetizada no citoplasma de células secretoras. Estas proteínas são transferidas para o retículo endoplasmático rugoso, onde perdem o peptídeo sinal e assumem sua forma protéica através da formação de pontes de dissulfeto, glicosilação e multimerizações, como a dimerização de desintegrinas (P-IIId/P-Ile) e adição de domínios tipo-lectina (P-IIIId). No complexo de Golgi essas proteínas são transportadas em vesículas até o lúmen das glândulas secretoras (WARSHAWSKY *et al.*, 1973; FOX e SERRANO, 2008b), onde a acidificação do meio, a presença de citrato (ODELL *et al.*, 1998) e de um tripeptídeo pyrol-glutamato (ROBEVA *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1998; MARQUES-PORTO *et al.*, 2008) provavelmente inibem a atividade proteolítica destas enzimas no lúmen glandular mantendo a integridade celular e das proteínas do veneno garantindo sua ação somente no momento do envenenamento.

1.4. Composição da peçonha de *B. pauloensis*: Origem das SVMPs

As peçonhas ofídicas são extensivamente estudadas com o intuito de compreender aspectos estruturais e mecanismos de ação de toxinas isoladas. São complexas misturas farmacologicamente ativa de proteínas e polipeptídios, produzidos e estocados em uma glândula altamente especializada. Também estão presentes citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos e em menor proporção aminoácidos livres e lipídeos (SOUZA *et al.*, 2001). As peçonhas do gênero *Bothrops* são formadas por uma variedade de toxinas as quais incluem metaloproteases, serinoproteases, desintegrinas, miotoxinas, fosfolipases A₂, L-amino oxidases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases, acetilcolinesterase,

arginina esterase, hialuronidase, 5'- nucleotidase e NAD-nucleosidase. Após a inoculação da peçonha, essas proteínas e polipeptídeos atuam sinérgica ou individualmente, desencadeando reações fisiopatológicas como parálisia, mionecrose, algumas vezes acompanhada de morte da vítima (DOLEY;KINI, 2009; KANG *et al*, 2011). Essa mistura de enzimas e proteínas não enzimáticas é usada tanto na imobilização quanto na digestão da presa além de servir como mecanismo de defesa contra predadores. Esse último responsável pelos raros e infortúnios envenenamentos de humanos. A peçonha pode sofrer alteração em sua composição de acordo com habitat, dieta, sazonalidade, idade e gênero dos indivíduos (CHIPPAUX *et al.*, 1991; MACKESSY *et al.*, 2003;EARL *et al.*, 2006).

O conhecimento da composição proteica dessas peçonhas tem uma importância significativa por revelar novos componentes com potencial farmacológico, os quais podem se tornar valiosos instrumentos de pesquisa nas diversas áreas do conhecimento.

A espécie *Bothrops pauloensis* (**Figura 8**), encontra-se distribuída pelos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e provavelmente na Bolívia. A dispersão e a variedade desses gêneros na América do Sul ocorreram por erradicações adaptativas. São extremamente variáveis em termos geográficos e ecológicos quando comparados com o gênero *Crotalus* (Kohlhoff *et al.*, 2012).



Figura 8 - Distribuição geográfica (em marrom) e padrão de manchas da espécie *B. pauloensis* (retirado de RODRIGUES R.S. *et al.* 2012); Reptile Database (<http://www.reptile-database.org>).

Rodrigues *et al.* (2012) demonstraram por técnicas proteômicas e transcriptômicas a variedade e natureza de toxinas presentes na peçonha de *Bothrops pauloensis* (**Figura 9**). Dentre as diversas proteínas com atividade enzimática isoladas de peçonhas botrópicas destacam-se as: L-aminoácido oxidases (LAAO), fosfolipases A₂, serinoproteínases e metaloproteases, cujas estruturas e mecanismos de ação vêm sendo elucidados por diferentes métodos. Um grande número de proteínas tem sido purificado e caracterizado a partir da peçonha de serpentes que contém de 30 a mais de 100 toxinas proteicas.

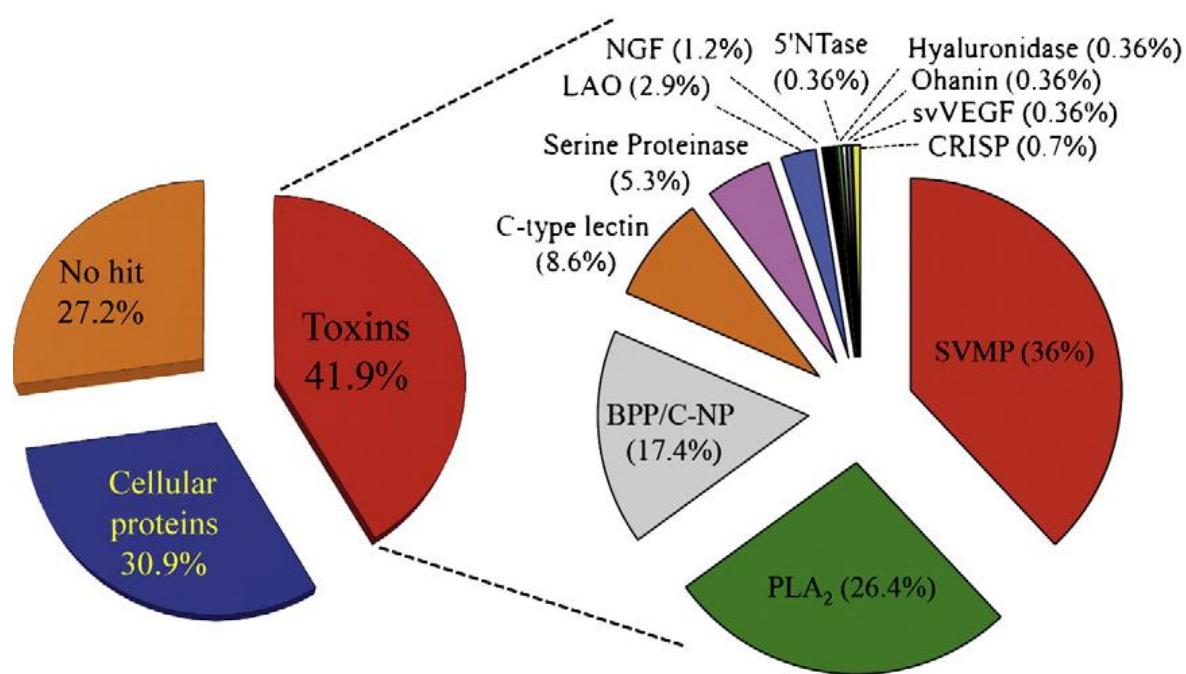


Figura 9 – Perfil transcriptômico da glândula de peçonha da serpente *B. pauloensis*. Abreviações: 5' NTase, 5' nucleotidase; svVEGF, snake venom vascular endothelial growth factors; CRISP, cisteine-rich secretory protein; SVMP, snake venom Zn²⁺-metaloproteinase; PLA₂, phospholipase A₂; BPP/C-NP, bradykinin-potentiating peptide/C-type natriuretic peptide; LAO, L-amino acid oxidase; NGF, nerve growth factor. (RODRIGUES *et al.* 2012).

As enzimas proteolíticas de peçonhas de serpentes (serinoproteínases, metaloproteínases, entre outras) tiveram sua origem, provavelmente, como enzimas digestivas e subsequentemente evoluíram por duplicação em seu gene e

alterações na sequência para exercer as demais funções (BIRKTOFT e BLOW, 1972).

Para explicar a geração de tanta diversidade molecular, as relações evolucionárias das PLA₂s, proteínas lectina-like tipo-C, inibidores de serinoproteases e metaloproteases, se desenvolveram sob forte seleção adaptativa positiva (OGAWA *et al.*, 2005; ZUPINSKI *et al.* 2003; MOURA-DA-SILVA, 1996). Alta variabilidade de proteínas da peçonha confere ao animal uma vantagem na capacidade de se adaptar à variação entre as diferentes presas (DALTRY, *et al.*, 1996). Casewell e col. (2011) propuseram que a evolução das SVMPs é repetidamente pontuada por perda de domínio para formar múltiplas estruturas P-I e P-II a partir de metaloproteases da classe P-III.

1.4.1 Ação das SVMPs: Hemostasia e Efeitos sobre células

O sangue e a normalidade em todos os eventos que ocorrem no interior dos vasos sanguíneos do organismo são essenciais para perpetuação da vida, portanto um processo que regula a fluidez do sangue no interior do sistema vascular é um importante processo fisiológico. A esse processo dá-se o nome de hemostasia. O termo hemostasia refere-se à resposta normal do vaso em caso de injúria, desencadeando uma série de eventos locais que culminam no estancamento do sangue evitando a hemorragia. O desequilíbrio da hemostasia pode levar à trombose, que é a formação de um tampão patológico, geralmente causado por um dano nas paredes do vaso, infecções, lentidão ou estagnação do fluxo sanguíneo. Os componentes essenciais para fluidez, hemostasia e trombose são os fluxos sanguíneos produzidos pelo ciclo cardíaco, o endotélio vascular e pelo próprio sangue (RASCHE, 2001).

O sistema hemostático humano é baseado em um grande número de interações complexas que envolvem proteínas sanguíneas, plaquetas, células endoteliais e estruturas subendoteliais (MARKLAND, 1998). No caso de injúria vascular traumática com ruptura de endotélio, a ativação plaquetária e fatores de coagulação estimulam uma resposta vigorosa (ROSENFELD; GRALNICK, 1997). As plaquetas ancoram no subendotélio por ligações formadas entre moléculas de adesão célula/receptores adesivos e ligantes adesivos/contra-receptores no

sangue e tecidos conectivos. Uma vez aderidas ao subendotélio, as plaquetas se espalham sobre a superfície, processo chamado de adesão plaquetária e, plaquetas adicionais, que chegam pelo fluxo sanguíneo, se aderem inicialmente a camada basal e depois umas as outras por pontes interplaquetárias formadas pelo fibrinogênio, formando um tampão de agregado de células, processo esse chamado de agregação plaquetária (primeira fase da hemostasia) (RASCHE, 2001).

A agregação plaquetária requer ativação via adenosina difosfato (ADP), o qual é liberado por organelas de armazenamento da plaqueta. A formação de fibrina representa a segunda fase da hemostasia. Ela é desencadeada por fatores pró-coagulantes como o fibrinogênio, fator V e fator de von Willebrand, secretados pelas plaquetas, por fatores teciduais, considerados componentes críticos dos elementos vasculares, (via extrínseca), e por ativação por contato (via intrínseca) do sistema de coagulação (BERG *et al.*, 2002).

A diversidade estrutural das SVMPs confere às mesmas a capacidade de interferir em diversos sistemas, dentre eles o sistema hemostático. De modo geral, a ação das SVMPs está relacionada à proteólise de vários componentes desde componentes da matriz extracelular, proteínas plasmáticas, proteínas da membrana celular e interação com receptores integrinas (WERMELINGER *et al.*, 2009), de células endoteliais (COMINNETTI *et al.*, 2004) e fibroblastos (ZIGRINO *et al.*, 2002). Essas funções fornecem às SVMPs grande potencial para atividades que resultem em processos fisiopatológicos tais como inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e hemorragia (MOURA-DA-SILVA & BALDO, 2012).

As SVMPs podem interferir na hemostasia por diferentes mecanismos, elas podem ser classificadas em enzimas pró-coagulantes ou anticoagulantes. As enzimas pró-coagulantes podem levar a ativação da protrombina e dos fatores X, V, IX. As anticoagulantes compreendem enzimas que podem agir sobre plaquetas e fibrinogênio (MATSUI *et al.*, 2000; RAMOS *et al.*, 2006). De uma forma geral, as principais atividades das SVMPs sobre a hemostasia são mediadas pela atividade proteolítica do domínio metaloprotease e ações anti-adesivas dos domínios desintegrina, *desintegrina like* e rico em cisteína. Vários trabalhos têm demonstrado a ação de SVMPs sobre proteínas do sistema

hemostático (ex.: fibrinogenio, fator X, protrombina). A metaloprotease BpMP-I é um exemplo de enzima isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* que age em elementos do sistema hemostático (NAVES-DE-SOUZA *et al.*, 2012).

As SVMPs da classe P-III têm sido designadas como as mais potentes toxinas hemorrágicas, mesmo havendo algumas SVMPs dessa classe que não apresentam atividade hemorrágica e sim pró-coagulante. Sendo assim atuam intensivamente sobre a hemostasia. As SVMPs da classe P-I podem ou não provocarem hemorragia. Essa atividade está condicionada à sequência de aminoácidos que formam a estrutura primária da enzima. Essa composição determina a especificidade da enzima aos componentes da matriz extracelular ou ao endotélio vascular levando à variação nos danos celulares (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2004). As metaloproteases da classe P-II podem inibir a agregação plaquetária por conterem em sua estrutura a sequência tripeptídica RGD (Arg-Gly-Asp) que pode interagir com integrinas de plaquetas impedindo a ligação dos agonistas pró-coagulantes (fibrinogênio, ADP e colágeno) (DA SILVA *et al.*, 2009).

Além de interferir com a função plaquetária, as SVMPs também podem ter ação em outros tipos celulares, como fibroblastos, cultura de macrófagos peritoneais, células musculares e células cancerígenas (ZIGRINO, *et al.*, 2002; CLISSA, *et al.*, 2001; LOPES, *et al.*, 2009; CORRÊA, *et al.*, 2002). Células envolvidas no processo hemostático, especialmente as células endoteliais, também são importantes alvos de ação das SVMPs. Essas enzimas podem interferir na adesão, e viabilidade de células endoteliais além de induzir apoptose. Um mecanismo de ativação de células endoteliais, exercido por SVMPs, é a indução de IL-8 e de moléculas de adesão (LOPES *et al.*, 2012).

Outro efeito causado pelas SVMPs é a atividade inflamatória grave observada após o envenenamento botrópico. SVMPs induzem a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, agravando o dano tecidual local que ocorre após o envenenamento. A resposta inflamatória em casos de picadas botrópicas é caracterizada por edema, recrutamento de leucócitos e liberação de citocinas. A *Neuwiedase* é um exemplo de SVMPs isolada da peçonha de *Bothrops neuwiedi* que atua induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação de algumas metaloproteases de matriz (MMPs) (LOPES *et al.*, 2009).

As SVMPs apresentam uma grande variedade de ações e mecanismos para interferência em processos fisiológicos. Com base nesse conhecimento atribui-se às SVMPs um alto potencial biotecnológico de aplicação em medicina no tratamento de desordens hemostáticas. SVMPs fibrinogenolíticas não hemorrágicas podem ser exploradas como agentes trombolíticos para dissolução de trombos (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006). Assim, metaloproteases são ótimas ferramentas a serem usadas em estudos moleculares, além de apresentarem alto potencial para serem utilizadas na produção de fármacos.

2.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRKTOFT, J.J.; BLOW D.M.; Structure of crystalline- chymotrypsin. V. The atomic structure of tosylchymotrypsin at 2 Å ° resolution. **J Mol Biol** 68, 187-240; 1972.
- BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemoragic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, p.325-372, 1994.
- BLUNDELL, T.L. Metalloproteinase superfamilies and drug design. **Nature Structural Biology**, v.1, p.73-75, 1994.
- BODE,W.; GOMIS-RUTH, F.X.; STOCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincs'. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, v. 331, p. 134-140, 1993.
- BORTOLETO, R. K.; MURAKAMI, M. T.; WATANABE, L.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification, characterization and crystallization of jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v.40, p.1307-1312, 2002.
- BRAUD, S.; BOM, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v.82, p 851-859, 2000.
- CAMPBELL, J.A., LAMAR, W.W. 2004. The venomous reptiles of Latin American. Ithaca-New York, **Comstock**, v.2, 870p.
- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279-1303, 1991.
- CLISSA PB, LAING GD, THEAKSTON RDG, MOTA I, TAYLOR MJ, MOURADA-SILVA AM. The effect of jarahagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon** 2001; **39**: 1567–1573.
- DALTRY, J.C.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S.: Diet and snake venom evolution. **Nature**; 379:537-540; 1996
- DA SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v.41, p.251-255, 2003
- DA SILVA, M.; LUCENA S.; AGUILAR, I.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; SALAZAR, A.M.; SÁNCHEZ, E.E.; GIRÓN, M.C.; CARVAJAL, Z.; AROCHA-PIÑANGO, C.L.; GUERRERO, B. Anti-platelet effect of cumanastatin 1, a disintegrin isolated from

venom of South American *Crotalus* rattlesnake. **Thrombosis Research** 123; 731–739; 2009.

DOBROVOLSKY, A.B.; TITAEVA, E.V. The fibrinolysis system: Regulation of activity and physiologic functions of its main components. **Biochemistry**, p. 67-99, 2002.

DOLEY, R.; KINI, R.M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 2851-2871, 2009.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neuroscience**, p. 16-99, 1993.

DU, X.Y.; CLEMENTSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v.40, p. 659-665, 2002.

EARL, S. T.; BIRRELL, G. W.; WALLIS, T. P.; PIERRE, L. D. St.; MASCI, P. P.; de JERSEY, J.; GORMAN, J. J. ; LAVIN, M. F. Post-translational modification accounts for the presence of varied forms of nerve growth factor in Australian elapid snake venoms. **Proteomics**, v. 6, p. 6554-6565, 2006.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L.; Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotoxin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v.45, p 969-985, 2005.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**, v.275, p 3016-3030, 2008.

FUNDACAO NACIONAL DE SAUDE. Manual de diagnostico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos . **Ministério da Saúde-Brasil**. 112 pp, 2001.

GOMIS-RUTH, F.X.; KRESS, L.F.; KELLERMANN, J.; MAYR, I.; LEE, X. ; HUBER R.; BODE, W. Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zinc-endopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. **Journal Molecular Biology**, v.239, p. 513-544, 1994.

GOMIS-RUTH, F.X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. The **Journal Biological Chemistry**, v. 23, p. 15353-15357, 2009.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini Rm, editor. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Chichester: Wiley & Sons, p. 321-52, 1997.

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841 – 850 , 2000.

GUTIERREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage, **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

GRAMS,R.; HUBER,R.; KRESS,L.F.; MORODER,L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinase by a cysteine switch-like mechanism. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, v. 335, p. 76-80, 1993.

HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTTO, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319-328, 2007.

HOOPER, N. Families of zinc metalloproteases. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, v.354, p. 182-191, 1994.

KAMIGUTI, A.S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 1041-1049, 2005.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x

KASTURIRATNE,A.; WICKREMASINGHE, R. A.; de SILVA, N.; GUNAWARDENA; N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALOO, D.G.; SILVA, H.J. The global burden of snakebite: A literature analysis

and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLOS Medicine** 5(11): e218.doi:10.1371/journal.pmed.0050218

KINI, R. M. Phospholipase A₂ – a complex multifunctional protein puzzle. 1997, In *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism* (Kini, R.M., ed), John Wiley, Chichester, 1p.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 27, p. 613-635, 1989.

KINI, R.M.; ZHANG, C.Y.; TAN, B.K.H. Pharmacological activity of the interdomain segment between metalloproteinase and disintegrin domains. **Toxicon**, v. 35, p. 529-535, 1997.

KINI, R. M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiology Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, 200-204, 2005.

KOHLHOFF, M.; BORGES, M.H., YARLEQUE, A., CABEZAS, C., RICHARDSON, M., SANCHEZ, E.F., Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*, **J Prot.**, 2012.

KRESS, L.F.; PAROSKI, E.A. Enzymatic inactivation of human serum proteinase inhibitors by snake venom proteinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v. 83, p. 649-656, 1978.

LAING, D.G; CLISSA, P.B; THEAKSTON, R.D.G; MOURA, DA.S; TAYLOR, M.J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloprotease-induced skin necrosis. **European Journal Immunology**, v.33, p 3458-3463, 2003.

LU, Q.M.; WEI, Q.; JIN, Y.; WEI, J.F.; WANG, W.Y.; XIONG, Y.L. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **Journal Natural Toxins**, v. 11, p. 345-352, 2002.

MACKESSY, S. P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K. G. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: A case of venom paedomorphosis? **Copeia**, p. 769-782, 2003.

MACKESSY, S. P., 2010. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**, 15p.

MALEMUD, C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. **Front Biosci.** May 1;11:1696-701; Review; 2006.

MANDLE, R.J.; COLMAN, R.W.; KAPLAN, A.P. Identification of pre-kallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v.73, p. 4179-4183, 1976.

MANNING, M.C. Sequence analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from *Agkistrodon contortrix contortrix*. **Toxicon**, v. 33, p. 1189-1200, 1995.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v.45, p. 1171-1181, 2005.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749 – 1800, 1998.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochemica et Biophysica Acta: BBA** 1477, 146-156; 2000.

MATRISIAN L. M., The matrix degrading metalloproteinases. **BioEssay**, v. 14, p 455-463, 1992.

MORITA, T.; IWANAGA, S. Prothrombin activator from *Echis carinatus* venom. **Methods Enzymology**, v. 80, p. 303-311, 1981.

MOSESSON, M.W.; SIEBENLIST, K.R.; MEH, D.A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. **Annals of the New York Academy Sciences** , v. 936, p. 11-30, 2001.

MOURA-DA-SILVA AM, THEAKSTON RGD, CRAMPTON JM: Evolution of disintegrin cystein-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. **J Mol Evol**, 43:263-269; 1996.

MOURA-DA-SILVA, A.M., BUTERA, D., TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Current Pharmaceutical Design**, in press, 2007.

MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. N. Thrombomodulin-independent activation of protein C and specificity of hemostatically active snake venom serine proteinases: crystal structures of native and inhibited *Agkistrodon contortrix contortrix* protein C activator. **Journal Biology Chemistry**, v. 280, p. 39309-39315, 2005.

NISHIDA, S.; FUJITA, T.; KOHNO, N.; ATODA, H.; MORITA, T.; TAKEYA, H.; KIDO, I.; PAYNE, M.J.; KAWABATA, S.; IWANAGA, S. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of prothrombin activator (ecarin) in *Echis carinatus* venom. **Biochemistry**, v.34, p. 1771-1778, 1995.

NUNEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; DE LA TORRE, P.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; CALVETE, J.J. Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 57-78, 2009.

OGAWA T, CHIJIWA T, ODA-UEDA N, OHNO M: Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, 45:1-14, 2005.

OWNBY, C.L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **Journal of Toxicology – Toxin Review**, v. 17, p. 1003-1009, 1998.

OWNBY, C.L.; ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v.37, p 411-445, 1999.

PAGE, M. J.; Di CERA, E. Serine peptidases: classification, structure, and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thrombosis Haemostasis**, v.79, p.675-683, 1998.

RASCHE, H. Haemostasis and thrombosis: an overview. **European Heart Journal Supplements**, 2001.

RAMOS, O.H.P; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Snake venom metalloprotease structure and function of catalytic and desintegrin domains. **Comparative biochemistry and Physiology, parte C** 142, p 328-346, 2006.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. D227-D233, 2010.

RODRIGUES, V.M., SOARES, A.M., GUERRA-SA, R., FONTES, M.R.M., GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorragic fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 381, 213-224, 2000.

SAKURAI, Y.; TAKATSUKA, H.; YOSHIOKA, A.; MATSUI, T.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJIMURA, Y. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. **Toxicon**, v. 39, p.1827-1833, 2001.

SANCHEZ, E.F.; COSTA, M.I.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; ASSAKURA, M.T.; MANDELBAUM, F.R.; DINIZ, C.R. Characterization of a hemorrhagic factor, LHF I, isolated from the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom. **Toxicon**, v. 33, p. 1653-1667, 1995.

SANCHEZ, E.F.; SWENSON, S. Proteases from South American snake venoms affecting fibrinolysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 3, p. 147-157, 2007.

SAXENA, P.; THOMPSON, P.; d'UDENKEN, Y.; KONSTANTINOV, I.E. Kallikrein-Kinin System: A Surgical Perspective in Post-Aprotinin Era. **Journal of Surgical Research**, v. 167, p. 70-77, 2011.

SCHALOSKE, R.H; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochemica et Biophysica Acta: BBA**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115-1132, 2005.

SILVA, V.X. Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). v.1e 2. **Tese** (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SILVA, V.X. da, 2004. The *Bothrops neuwiedi* complex, p.410-422. In Campbell, J.A. & Lamar, W.W. (ed.). **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Comstock, Ithaca, London.

SILVA, V.X.; RODRIGUES, M.T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phylomedusa**, v. 7, n.1, p. 45-90, 2008.

SOARES, A.M; FONTES, M.R.M; GIGLIO, J.R. Phospholipases A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Current Organic Chemistry** v.8, p1677-1690, 2004.

SOUZA J. R. F.; MONTEIRO R. Q.; CASTRO H. C.; ZINGALI R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents, **Toxicon**, v. 39, p 787-792, 2001.

SPRINGMAN, E.B.; ANGLETON, E.L.; BIRKEDAL-HANSEN, H.; VAN WART, H.E. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. Jan;87(1):364-8, 1990.

STABELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2881-2886, 2004.

STOCKER,W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F.X.; McKAY, D.B.; BODE, W. The metzincins – Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Science**, v. 4, p. 823-840, 1995.

SWENSON, S.; MARKLAND, F.S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, p. 1021-1039, 2005.

STOCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zincendopeptidases: the metzincins. **Current Opinion Structural Biology**, v.3, p.383- 390, 1995.

TAKATSUKA, H.; SAKURAI, Y.; YOSHIOKA, A.; et al. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta: BBA**, v. 1544, p. 267-277, 2001.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta: BBA**, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.04.009.

TORRENT, R. M. R.; BONGIOVANNI, B.; LEIVA, L. C.; DUFFARD, A. M. E.; RODRIGUEZ, J. P.; PEREZ, O. C. A.; DUFFARD, R. Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study). **Toxicon**, v.50, p. 144-152, 2007.

VALENTE, R.H.; GUIMARAES, P.R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A.G.C.; SOARES, M.R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M.R.O.; LEON, I.R.; ROCHA, S.L.G.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; WERMELINGER, L.S.; DUTRA, D.L.S.; LEAO, L.I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; HO, P.L.; ZINGALI, R.B.; PERALES, J.; DOMONT, G.B. *Bothrops insularis* venomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 241-255, 2009.

WANG, W.J.; SHIH, C.H.; HUANG, T.F. Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochimie**, v.87, p. 1065-1077, 2005.

WARD,C.M; ANDREWS, R.K.; SMITH, A.I.; BERNDT, M.C. Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand factor receptor glycoprotein Ibalpha. Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of Ibalpha as a binding site for von Willebrand factor and alpha-thrombin. **Biochemistry**, v. 35, p. 4929-4938, 1996.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 77-88, 2010.

WATANABE, L.; SHANNON, J.D.; VALENTE, R.H.; RUCAVADO, A.; ALAPEGIRON, A.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; FOX, J.W.; GUTIERREZ, J.M.; ARNI, R.K. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein Science**, v.12, p. 2273-2281, 2003.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951 - 967, 2005.

WIJEYEWICKREMA, L.C.; GARDINER, E.E.; MOROI, M.; BERNDT, M.C.; ANDREWS, R.K. Snake venom metalloproteinases, crotarhagin and alborhagin, induce ectodomain shedding of the platelet collagen receptor, glycoprotein VI. **Journal Thrombosis Haemostasis**, v. 98, p. 1285-1290, 2007.

WU, W.B.; PENG, H.C.; HUANG, T.F. Crotalin, a vWF and GP Ib cleaving metalloproteinase from venom of *Crotalus atrox*. **Journal Thrombosis Haemostasis**, v. 86, p. 1501-1511, 2001.

VALLE, A.L.; BRITES, V.L.C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.10, p 155-161, 2008.

XU, X.L.; LIU, X.H.; WU, B.; LIU, Y.; LIU, W.Q.; XIE, Y.S.; LIU, L.Q. Metal-ion- and pH-induced conformational changes of acutolysin D from *Agkistrodon acutus* venom probed by fluorescent spectroscopy. **Biopolymers**, v. 74, p. 336-344, 2004.

YAMADA, D.; SEKIYA, F.; MORITA, T. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. **Journal Biology Chemistry**, v. 271, p. 5200-5207, 1996.

ZIGRINO, P.; KAMIGUTI, A.S.; EBLE, J.; DRESCHER, C.; NISCHT, R.; FOX, J.W.; MAUCH, C. The reprolysin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. **J Biol Chem**; 277:40528-40535, 2002.

ZULIANI, J.P.; KAYANO, A.M.; ZAQUEO, K.D.; NETO, A.C.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; STABELI, R.G. Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. **Protein and Peptides Letters**, v. 16, p. 908-912, 2009.

ZUPINSKI, V.; KORDIS, D.; GUBENSEK, F.: Adaptative evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. **FEBS Lett** 547:131-136, 2003.

Capítulo 2:

**Análise bioquímica e funcional de uma
metaloprotease PI (BpMPII) isolada da peçonha de
*Bothrops pauloensis***

**Análise bioquímica e funcional de uma metaloprotease PI (BpMPII)
isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis***

David Collares Achê^{a,d}, Mario Sergio R. Gomes^{a,b,d}, Dayane Naves de Sousa^{a,d}, Marcia Helena Borges^c, Daiana Silva Lopes^{a,d}, Kelly A. Tudini, Renata S. Rodrigues, Veridiana M. Rodrigues^{a,d*}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU),
Uberlândia-MG, Brasil.

^b Departamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da
Bahia (UESB), Jequié-BA, Brasil.

^c Fundação Ezequiel Dias, FUNED, Belo Horizonte – MG, Brasil

^d Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica
(INCT/Biofar), Belo Horizonte-MG, Brasil.

*Corresponding author: Prof. Dr. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e-mail:
veridiana@ingebr.ufu.br FAX. 55 34-3218-2203.

Resumo

Proteases são enzimas abundantemente encontradas em todos os cinco grandes reinos de seres vivos. Essas enzimas proteolíticas provenientes da natureza têm sido alvos de estudos com a finalidade de buscar ferramentas de uso terapêutico por atuarem em diversos processos fisiopatológicos. Metaloproteases são enzimas proteolíticas da classe das hidrolases que dependem da ligação de um metal em seu sítio ativo (geralmente o zinco) para exercer suas atividades. Essas enzimas participam de diversos eventos fisiológicos e patológicos. As metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMPs) estão entre as toxinas animais mais estudadas. Elas são divididas em classes (PI, PII e PIII) de acordo com a composição estrutural e a presença de domínios. As metaloproteases da classe PI contêm um pró-domínio e o domínio catalítico em sua estrutura. No presente trabalho, nós descrevemos as características bioquímicas e funcionais de uma metaloprotease da classe PI denominada *Bothrops pauloensis* Metalloproteinase-II (BpMP-II), isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*. BpMP-II foi purificada utilizando-se três passos cromatográficos em resinas de troca catiônica CM-Sepharose *Fast Flow*, coluna de gel filtração Sephadex S-300 e resina de troca aniônica HisTrap Capto-Q. A enzima isolada apresentou-se homogênea em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras e não-redutoras, com uma massa molecular de 23kDa determinada por espectrometria de massas MALDI-TOF. O ensaio de focalização isoelétrica resultou em um pl levemente ácido de 6,1 para a BpMP-II. A sequência parcial da proteína determinada por MS/MS (MALDI – TOF/TOF) apresentou alta similaridade estrutural com outras SVMPs com score bastante significativo. BpMP-II mostrou alta atividade proteolítica sobre azocaseína sob diferentes condições experimentais e sobre o fibrinogênio bovino com variação de dose, pH. BpMP-II foi inibida por EDTA, 1,10 fenantrolina (agentes quelantes) e β-mercaptoetanol (agente redutor ligação S-S). Além disso, esta protease apresentou estabilidade em pH neutro ou alcalino e foi inativada em temperaturas elevadas (60°C). BpMP-II mostrou ser citotóxica para células tEnd em concentrações acima de 20μg/μL. Um leve aumento nos níveis de creatina quinase (CK) foi observado quando injetada

intramuscularmente em camundongos. Assim, o presente trabalho permitiu identificar e caracterizar uma molécula com grande potencial de aplicação terapêutica.

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis*, metaloproteases de peçonha de serpentes, atividades enzimáticas, citotoxicidade.

Abstract

Proteases are enzymes widely found in all five life being kingdoms. These proteolytic enzymes have been studied and can be used as therapeutic tools due to their actions on physiopathologic events. Metalloproteinase are hydrolytic zinc-binding dependent enzymes which interfere in physiological processes. Snake venom metalloproteinase are widely studied animal toxins. They are divided into classes (PI, PII and PIII) and PI metalloproteinase are composed of a pro-domain and a catalytic domain in its structure. In the present work, we demonstrated the biochemical and functional characteristics of a PI- metalloproteinase (BpMP-II) isolated from *B. pauloensis* venom. BpMP-II was purified in three chromatography steps on cation exchange resin CM-Sepharose Fast flow, filtration Sephadryl S-300 and anion exchange Capto-Q. The isolated enzyme was homogeneous on SDS-PAGE under reduction and non-reduction conditions, with a molecular weight of 23kDa determined by MALDI-TOF mass spectrometry. The isoelectric focalization demonstrated a slight acid pI (6,1) of BpMP-II. The partial sequence of protein was determined by MS/MS (MALDI-TOF/TOF) and showed high structural similarity with others SVMPs as well as a significant score match. BpMP-II showed high proteolytic activity upon azocasein and bovine fibrinogen and was inhibited by EDTA, 1,10 phenanthroline and β -mercaptoethanol. Moreover, this enzyme showed stability at neutral and alkaline pH and it was inactivated at temperatures higher than 60°C. Concentrations higher than 20 μ g of BpMP-II was able to decrease tEnd cells viability. A slight increase in creatine kinase (CK) levels was noticed when BpMP-II was administrated an intramuscular route on mice. Therefore, the present work permitted the identification and characterization of a molecule with great therapeutic potential.

Key Words: *Bothrops pauloensis*, Snake venom metalloproteinase, enzymatic activity, citotoxicity.

1.0. INTRODUÇÃO

Metaloproteases ou metaloendopeptidases (MP) são enzimas hidrolíticas classificadas como endopeptidases (E.C.3.4.24) que dependem da ligação de um metal, cobalto, níquel, manganês ou na maioria das moléculas, o zinco, em seu sítio catalítico para exercerem suas atividades. Estas possuem um alto nível de abrangência em efeitos fisiológicos e patológicos importantes como adesão celular, fertilização, transdução de sinais, reparo da matriz, indução de tumores, processos aterotrombóticos, intoxicação por animais peçonhentos, etc. Estas enzimas ocorrem amplamente em todos os cinco grandes reinos dos seres vivos (GOMIS-RÜTH *et al.*, 2003; GOMIS-RÜTH *et al.*, 2012), sendo que as metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases*) estão entre as toxinas animais mais estudadas.

As SVMPs apresentam um amplo espectro de massa molecular (20 a 110 kDa) de acordo com o número de domínios estruturais presentes. Estes domínios têm sido amplamente caracterizados quanto às suas funções específicas e são denominados de: catalítico, desintegrina ou desintegrina-like, rico em cisteína e por fim o domínio lectina-like. De acordo com a presença dos domínios estruturais e a massa molecular, as SVMPs foram inicialmente classificadas em quatro classes, designadas P I, P II, P III e P IV (BJARNASON e FOX, 1994). Fox e Serrano (2008) propuseram uma nova classificação apresentando 11 subclasses: Pla, PlIa, PlIb, PlIc, PlId, PlIe, D-I, PlIIa, PlIIb, PlIIc e PlIId. Nesta nova proposta tomaram-se como base os estudos sobre precursores de SVMPs e sobre os produtos gerados por modificações pós traducionais. Assim, foram incorporadas as metaloproteases diméricas, desintegrinas livres, desintegrinas diméricas, desintegrinas como produtos de autólise das metaloproteases, domínios tipo desintegrina/rico em cisteína. As metaloproteases da classe P-IV foram incorporadas em uma nova subclasse denominada P-IIId, pois em estudos realizados até o presente momento não foram identificados mRNAs que traduzam todos os domínios presentes neste tipo de proteína.

A complexidade estrutural das SVMPs confere às mesmas uma capacidade de interferir em diversos processos fisiológicos. O principal efeito atribuído à ação de metaloproteases está relacionado à sua capacidade de

degradar componentes da matriz extracelular, proteínas de membrana celular e proteínas plasmáticas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; BERNARDES *et al.*, 2013; KAMIGUTI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2008). Além dessa ação, as metaloproteases também são capazes de interagir com receptores específicos, como integrinas de superfície de plaquetas (DE LUCA *et al.*, 1995; YOU *et al.*, 2006), células endoteliais (SOUZA *et al.*, 2000; COMINNETTI *et al.*, 2004) e fibroblastos (ZIGRINO *et al.*, 2002), ativando ou inibindo a resposta celular. Todos esses efeitos podem resultar em várias alterações fisiopatológicas tais como, hemorragia, mionecrose, inflamação, inibição da agregação plaquetária e apoptose (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; HERRERA *et al.*, 2013; MARKLAND e SWENSON, 2013).

Dentre as toxinas presentes na peçonha de *B. pauloensis*, as metaloproteases foram as mais abundantes (37%) seguido das fosfolipases A₂ (26-32%) e peptídeos potencializadores de bradicinina vasoativos (15%). Apesar dos estudos de proteômica revelarem um alto conteúdo de SVMPs presentes na peçonha de *B. pauloensis* (Rodrigues *et al.*, 2012), até o momento apenas duas metaloproteases foram isoladas, a saber: a BpMPI (NAVES, *et al.* 2012) e Bothropoidin (GOMES, M.S.R., 2013), ambas tiveram suas propriedades funcionais e estruturais determinadas.

As SVMPs têm se tornado importantes alvos de pesquisas nos anos recentes, pois podem ser utilizados como modelos para o desenvolvimento de agentes antitumoral, antiparasitários, antimicrobiano e trombolíticos (KENNY & BISSELL, 2007). Diante disso e da grande diversidade de metaloproteases presentes na peçonha de *B. pauloensis*, o presente trabalho teve como objetivo isolar uma metaloprotease dessa peçonha e caracterizá-la estrutural e funcionalmente.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Peçonha e animais

A peçonha de *Bothrops pauloensis* foi obtida a partir de espécimes mantidas no Serpentário Proteína Bioativas LTDA, estabelecido na Fazenda Boa Esperança S/N – Zona Rural – Batatais/SP. Este serpentário possui comprovante de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (nº de cadastro: 471301). A peçonha liofilizada foi pesada, dissolvida em salina tamponada (PBS) pH 7,2 e centrifugada a 3.000xg por 10 min. Os camundongos machos isogênicos da linhagem BALB/c foram mantidos em condições padrão de luz (ciclo de 12h luz/12h escuro em temperatura ambiente) no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com água e suplemento alimentar “*ad libitum*”. Os cuidados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA, Protocolo nº 063/08 e nº 046/09) da Universidade Federal de Uberlândia e estavam de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/ Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (COBEA/SBCAL).

2.2. Reagentes para eletroforese, cromatografia, seqüenciamento, ensaios enzimáticos e biológicos

Colunas cromatográficas CM-Sepharose, Sephadex G-25 e Capto -Q foram obtidas da Amersham Biosciences do Brasil. Acrilamida, bisacrilamida, N,N,N’,N’-tetrametilelenodiamino (TEMED), dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, fibrinogênio bovino, azocaseína, azul de bromofenol, ácido etilenodiaminotetracetico (EDTA), aprotinina, benzamidina, 1,10-fenantrolina, soroalbumina bovina (BSA) obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Padrão de massa molecular foram obtidos da GE Health Care. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) da SIGMA. Os demais reagentes utilizados neste estudo eram de grau analítico.

2.3. Cultura de células

Neste trabalho foram utilizadas células endoteliais murinas na linhagem tEnd (Thymic endothelium), estabelecida por Bussolino et. al. (1991). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 acrescido com 10% de soro fetal bovino e suplementado com 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, mantidas em estufa 37°C e 5% CO₂.

2.4. Isolamento da metaloprotease BpMPII

2.4.1. Cromatografia CM-sepharose *Fast Flow*

Inicialmente 200mg da peçonha de *B. pauloensis* foram ressuspensos em 2mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M, pH 7,8. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 100xg por 10min, a 4°C. O sobrenadante límpido retirado foi dosado (115mg) e, em seguida, aplicado a uma coluna contendo resina CM-Sepharose *Fast Flow*, previamente equilibrada no mesmo tampão.

Para a eluição das proteínas ligadas à coluna foi utilizado um gradiente convexo de concentração molar de AMBIC 0,05M a 0,5M (pH 7,8), a temperatura ambiente. As frações foram coletadas em 1mL/tubo em fluxo de 6,5mL/h por um coletor de frações Redifrac (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). As frações foram monitoradas através do espectrofotômetro Ultrospec 1000 – Amersham Pharmacia Biotech, com uma absorbância a 280nm. O perfil cromatográfico foi traçado e as amostras de proteínas foram separadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

2.4.2. Cromatografia em gel de filtração Sephadex S300

A fração CM1 (40mg) obtida da cromatografia em CM-Sepharose foi ressuspensa em AMBIC 0,5M e aplicada em uma coluna HiPrep 26/60 Sephadex S300 HR previamente equilibrada com tampão AMBIC 0,05M pH 7,8.

A eluição da amostra foi realizada no mesmo tampão com um fluxo de 0,2 mL/min no sistema Akta Prime Plus (Amersham Biosciences) em frações de 2mL por tubo, e de acordo com o cromatograma, frações foram coletadas, liofilizadas e mantidas a -20°C.

2.4.3. Cromatografia de troca iônica em Capto-Q

A fração CM1S3 proveniente da Sephadryl S300 foi então submetida à cromatografia de troca iônica em coluna aniônica HiTrap Capto Q previamente equilibrada com AMBIC 0,05M pH 7.8. Frações de 1mL/ tubo foram coletadas em um gradiente linear com tampão AMBIC 0,5M com fluxo de 0,4 mL/min em um sistema Äkta Prime Plus (Amersham Biosciences). De acordo com o cromatograma obtido, os picos foram coletados, liofilizados e mantidos a -20°C.

2.4.4. Cromatografia de alta eficiência em modo fase reversa (HPLCRP)

A fração principal proveniente da HiTrap Capto-Q (BpMP-II) foi diluída em 1mL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) e submetida ao sistema de HPLC-RP (Partisphere C18 WHATMAN®) (4,6mm x 125mm). A eluição da amostra foi inicialmente realizada em solução de ácido trifluoracético 0,1% (v/v), seguindo com gradiente de concentração linear de acetonitrila 80% em um fluxo de 1 mL/min a temperatura ambiente. O pico principal foi separado e liofilizado para determinação das propriedades químicas e estruturais.

2.5. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Nesse método, uma alíquota de cada amostra foi dissolvida para 100µL com água deionizada e adicionados 3mL do reagente de Bradford (100mg de Coomassie Blue G, 50mL de etanol 100%, 100mL de ácido fosfórico 85% e água deionizada suficiente para completar 1 litro de solução). As dosagens foram feitas em triplicatas e a absorbância medida a 595nm. Paralelamente à dosagem de proteínas, foi construída uma curva padrão de soroalbumina bovina (BSA)

(1mg/mL), considerando o coeficiente de extinção molar em 280nm (0,665). A concentração de proteínas em µg/µL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

2.6. Caracterização bioquímica

2.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)

Eletroforeses com agentes desnaturantes (SDS PAGE) foram realizadas segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu de: gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% e gel de separação a 12,5% contendo Tris-HCl 2,0 pH 8,8 e SDS 0,1%, mantendo a relação de bis:acrilamida 0,8:30. Todos os géis foram preparados num sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical. Amostras contendo 10µg de proteína foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,0625M pH 6,8; Glicerol a 10%; β-mercaptoetanol 5% ; 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol (condição redutora). As soluções foram aquecidas a 95°C por 4 minutos em banho-maria e aplicadas em gel de eletroforese. Os padrões de massa molecular utilizados foram: Albumina Bovina 66 kDa; Ovoalbumina 45 kDa; Anidrase carbonica 29 kDa; Tripsinogenio 24 kDa; β-lactoglobulina 18 kDa; α-lactoalbumina 14 kDa.

O tampão do eletrodo continha Tris-HCl 0,025M, Glicina 0,19M e SDS 0,1%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada em corrente de 15 mA até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel. O gel foi corado em solução de coomassie blue-R250 0,1% em água, ácido acético 10% e metanol 50% e descorado em solução de ácido acético a 7% e etanol 30% para posterior análise.

A mobilidade eletroforética relativa de cada banda foi determinada em centímetros e a massa molecular foi calculada, relacionando o logaritmo da massa molecular do padrão com a mobilidade eletroforética relativa.

2.6.2. Determinação da massa molecular por MALDI-TOF

A massa molecular da metaloprotease BpMPII foi determinada por espectrometria de massas com ionização e dessorção de matriz assistida por laser (MALDI-TOF-MS) (*Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*). As análises foram realizadas em espectrofotômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF, modelo AutoFlex III Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Cerca de 80 µg de proteína liofilizada foi ressuspendido em 10 µL de 0,1% ácido trifluoracético/H₂O e posteriormente 0,5 µL dessa solução foram misturados com 0,5 µL de solução matriz de ácido sinapínico a 10 mg/mL em Acetonitrila (ACN): Ácido trifluoroacético 0,1 %. Estas misturas foram aplicadas diretamente na placa MALDI TARGET (Bruker Daltonis), onde foram homogeneizadas e secas à temperatura ambiente. Para calibragem do equipamento foi utilizado mistura de proteína padrão (Tripsinogênio, Proteína A, Albumina-bovina) também aplicadas na mesma placa. Os espectros de massa foram adquiridos no modo linear positivo, após calibragem do aparelho. A faixa de massas moleculares avaliada foi de 3.000-80.000 m/z.

2.6.3. Focalização Isoelétrica

A focalização isoelétrica da proteína foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). Cerca de 25µg de proteína foram ressuspensos em 125µL de tampão de reidratação (uréia 7M, thiouréia 2M, 2% CHAPS (w/v), DTT 10mM, azul de bromofenol 0.002%), contendo também tampão IPG 0,5% (v/v), pH 3-10 (GE Healthcare). As tiras de poliacrilamida (7 cm de comprimento) com gradiente de pH imobilizado (pH de 3 a 10) foram reidratadas no sistema IPGbox durante 16 horas. Posteriormente, foi realizada a focalização isoelétrica das fitas no sistema Ettan IPGphor 3 com o seguinte programa: 200 V/1h, 3000 V/1h, 4000V/1h, 1250V/h e 50V por 1h.

Entre a primeira e a segunda dimensão, as tiras focalizadas foram equilibradas em 10mL solução Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, ureia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,002% (m/v) contendo 10 mg/mL de ditiotreitol (DTT), durante 15 minutos. Em seguida, foi realizado um

segundo equilíbrio utilizando a mesma solução adicionada de 25mg/mL iodoacetamida por 15 minutos. Após o processo de equilíbrio, as tiras foram submetidas a SDS-PAGE 12.5% no sistema de eletroforese Mini VE (GE Healthcare), tal como descrito pelo fabricante, e o gel foi corado com Coomassie G-250 a 2% (w/v.)

O gel foi escaneado em scanner de imagens (GE Healthcare), usando *Image Master LabScanTM v Programa 5.0*, com uma resolução de 300 dpi. A análise foi realizada por Imagem *Platinum 2D Mestre v* (GE Healthcare).

2.7. Caracterização Estrutural

2.7.1. Determinação da sequência

A metaloprotease BpMP-II (100µg) foi diluída em NH₄HCO₃ 100mM e ureia 8M e reduzida com DTT 10mM em NH₄HCO₃ 50Mm, a 37°C durante 60 min. A alquilação foi realizada com 50mM de iodoacetamida em NH₄HCO₃ 50mM a 37°C durante 30 min no escuro. A tripsinização foi realizada adicionando uma alíquota de tripsina Gold 0,5µg/2.5µL (Promega, Madison, WI, EUA) e a reação ocorreu *overnight* a 37°C, sendo interrompida pela adição de TFA 1% e a mistura de peptídeos foi concentrada em Speed-Vac. Os produtos da clivagem foram dessalinizados por cromatografia em uma coluna Sep-Pak C18 (Millipore) (10 x 10mm) usando um gradiente linear de 0 a 70% de acetonitrila em solução de 0,1% TFA. 1µL da amostra foi adicionado a 3µL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (α-CHCA). Em seguida, 1µL dessa mistura foi aplicado sobre a placa (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e seca à temperatura ambiente.

As massas peptídicas monoisotópicas foram determinadas em modo refletor com calibração externa, utilizando-se um calibrante padrão de peptídeos (Bruker Daltonics Billerica, EUA). Espectros de peptídeos (MS/MS) foram realizados pela fragmentação LIFT. Os espectros de massa foram analisados pelo software *Biotools* (Bruker Daltonics) e a identificação da proteína foi realizada com o software *Mascot* (Perkins *et al.*, 1999). A estrutura primária da BpMP-II obtida por MS/MS foi comparada com outras sequências

do banco de dados relatadas no NCBI usando os programas FASTA3 e o BLAST. Para alinhamento das sequências depositadas no banco com a sequência dos fragmentos obtidos foi utilizado o programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007)

2.8. Caracterização Enzimática

2.8.1. Atividade proteolítica sobre a Azocaseína

A caracterização enzimática da BpMP-II foi avaliada inicialmente utilizando a azocaseína como substrato de acordo com a metodologia descrita previamente por Gomes e colaboradores (2011) e modificada por Naves *et al.*, 2012. Soluções de azocaseína (1mg/mL) foram preparadas em tampão Tris 0,05M e NaCl 0,15M com pH 7. Em seguida, essa solução foi colocada em uma placa de 96 poços (NUNC MaxiSorp) (160µL/poço) e para iniciar a reação foi adicionada 45µL de tampão fosfato de sódio (PBS) contendo diferentes quantidade da toxina purificada (0,5µg, 1µg, 2µg, 5µg, 10µg e 20µg). Após 30 minutos de incubação a 37°C foram adicionados 45µL da solução de ácido tricloroacético 20% (m/v). A placa foi deixada por 30 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 1856 xg por 20min, o sobrenadante foi transferido e a absorbância foi determinada a 405nm na leitora EL800-Biotek. Uma unidade (U) de atividade azocaseinolítica é definida como sendo o acréscimo de 0,01 unidades de absorbância a 405nm em relação às condições do ensaio controle. Os ensaios foram realizados em triplicatas. Os resultados foram plotados em gráfico.

O efeito do pH na atividade proteolítica da BpMP-II (10µg) foi determinada preparando-se previamente a enzima em diferentes soluções tampões (50 mM) de pHs variáveis (tampão glicina-HCl pH 2,5; tampão citrato pH 5; tampão fosfato de sódio pH 7,5, e tampão borato pH 10,5) e incubando-os por 1h a 37°C. Posteriormente, a estas soluções foram adicionadas 160µL de azocaseína a 1mg/mL. Para o grupo controle foi incubado o substrato somente com PBS. Os ensaios foram conduzidos conforme descrito acima.

A estabilidade térmica da BpMP-II (10 μ g) também foi ensaiada, preincubando soluções da enzima (5 μ g) a diferentes temperaturas (4°C a 100°C) por 1h em pH 7,4, e posteriormente, a atividade azocaseinolítica foi determinada em pH 7,8 a 37°C.

2.8.2. Atividade Fibrinogenolítica

Esta atividade foi realizada segundo Rodrigues *et al.* (2000), com algumas modificações. Amostras contendo soluções (50 μ L) de fibrinogênio bovino (1mg/ml em PBS pH 7,8) foram incubadas com diferentes concentrações da enzima (1 μ g; 2 μ g; 5 μ g; 10 μ g; 20 μ g) por 1h a 37°C. A reação foi interrompida com a adição de 25 μ L de solução contendo Tris-HCl 0,06M pH 6,8, 2% (m/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 10% (v/v) β -mercaptoenol e 0,05% (m/v) azul de bromofenol. Após, as amostras foram aquecidas a 100°C por 4 minutos e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% com SDS (SDS-PAGE), como descrito no item 2.5.1.

A capacidade da BpMPII em degradar o fibrinogênio também foi avaliada variando-se o tempo de incubação (5min, 10min, 15min, 30min, 1h, 2h e 24h) a 37°C, e na presença de inibidores de proteases e agentes redutores quelantes. 5 μ g da enzima foram pré-incubados com 10 μ L de β -mercaptoetanol (10mM), EDTA(10mM), 1,10- fenantrolina (10mM), benzamidina (10mM) e aprotinina (10mM) por 1h a 37°C. Posteriormente, foram adicionadas as amostras 50 μ L de fibrinogênio bovino (1mg/mL em PBS pH 7,8). Os produtos da reação foram analisados em SDS-PAGE 12,5%.

2.8.3. Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica da BpMPII foi determinada por um ensaio realizado segundo método descrito por Nikai e colaboradores (1984). Foram administradas, por via intradérmica, doses da peçonha de *B. pauloensis* e da protease BpMPII (10 μ g e 50 μ g, respectivamente) no dorso de camundongos Balb-C machos (18-22g, n=4) para indução do processo hemorrágico. Os animais foram anestesiados, três horas após a inoculação, com soluções de

ketamina® 10% (0,05ml/kg) + xilasina 2% (0,025ml/kg) e posteriormente sacrificados. As peles foram removidas e a área hemorrágica foi medida utilizando-se um paquímetro de baixa pressão (CALIPER).

2.8.4 Atividade Miotóxica por dosagem de Creatina Cinase (CK)

Camundongos *Balb-c* machos (20 - 25g, n=3) receberam por via intramuscular (*i.m.*) no músculo gasctrocnenio direito doses de 20 μ g contendo a BpMP-II. Três horas depois os camundongos foram previamente anestesiados com (ketamina® 10% (0,05ml/kg) + xilasina® 2% (0,025ml/kg) e sacrificados por deslocamento cervical. O sangue foi coletado por punção cardíaca na presença de heparina e imediatamente centrifugado a 2.500 x g por 10 minutos a 4°C. A quantificação dos níveis de creatina cinase (CK-EC. 2.7.3.2) no plasma obtido foi determinada utilizando a metodologia descrita no Kit CK-UV kinetic (Biotécnia). Esta atividade foi expressa em unidades por litro (U/L), cada unidade corresponde à produção de 1 μ mol de NADH por minuto a 30°C. Foram formados os seguintes grupos: Controles (animais receberam somente solução PBS ou 10 μ g de peçonha bruta); Testes (animais receberam amostras contendo BpMP-II - 20 μ g).

2.8.5. Viabilidade celular

A viabilidade celular de culturas de células tEnd tratadas com BpMP-I e BpMP-II (metaloprotease obtida previamente da peçonha de *Bothrops pauloensis* de acordo com a metodologia descrita por Naves de Souza *et al.*, 2012) foi avaliada pelo método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Para determinar a viabilidade celular, 1,5x10⁴ células/poço foram semeadas em microplacas de cultura de 96 poços. Após a adesão celular, o meio foi trocado e as células foram tratadas com diferentes concentrações de BpMP-I e BpMP-II (25 μ g/mL) por um período de 24 horas. Culturas tratadas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. Após 24 horas de incubação foram adicionados diretamente sobre o meio de cultura 20 μ L de uma solução contendo 5mg/mL de MTT e a cultura foi mantida a 37°C por 3h. Após este período foram adicionados 100 μ L de uma solução de SDS 10%/HCl 0,01M durante um período de 18h. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da densidade óptica a 570 nm em um leitor de ELISA (BioTeK – Elx50).

2.9. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados com desvio padrão médio. Para a determinação da significância entre as médias, fez-se análise de variância (ANOVA) e o teste t, com significância de $p < 0,05$ usando o programa Prisma.

3.0. RESULTADOS

3.1. Isolamento e caracterização bioquímica da BpM_{II}

O fracionamento de 200mg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em coluna cromatográfica CM-Sepharose de troca-iônica resultou em seis frações que foram nomeadas CM1, CM2, CM3, CM4, CM5a e CM5b (**Figura 1A**). Essas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C. Em seguida foram feitas análises eletroforéticas em gel de poliacrilamida 12,5% das frações obtidas como mostra a **Figura 1B**. A fração CM1 mostrou-se bastante heterogênea e com atividade proteolítica expressiva sobre o substrato azocaseína (**Tabela I**). Esta fração foi escolhida para os passos de purificação subsequentes e quando aplicada a uma coluna de gel de filtração Sephadex G-25 resultou em sete picos de absorbância em 280nm denominados CMS1, CMS2, CMS3, CMS4, CMS5, CMS6 e CMS7 (**Figura 2A**). As frações foram coletadas, liofilizadas e analisadas em gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5%. Nesta análise observou-se que a fração CM1S3 apresentou uma banda majoritária com massa molecular aproximada de 22,5kDa (**Figura 2B**).

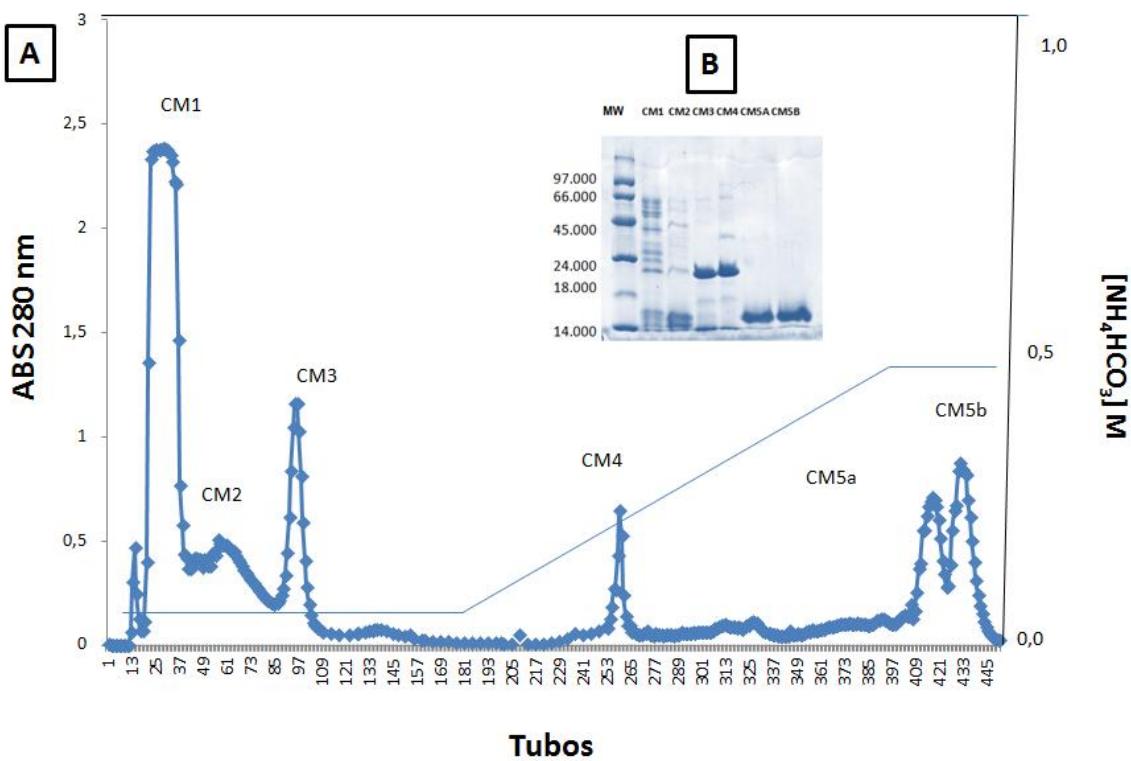


Figura 1: (A) Perfil cromatográfico da peçonha bruta (200mg) em CM-Sepharose *Fast Flow* equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,8. Um gradiente convexo foi aplicado à coluna utilizando-se o tampão bicarbonato de amônio 0,5M pH 7,8. Frações de 1mL/tubo foram coletadas com um fluxo de 6mL/h a temperatura ambiente. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% com as frações obtidas da cromatografia em CM-Sepharose. 1: MW (padrão de massa molecular); 2: fração CM1; 3: CM2; 4: CM3; 5: CM4; 6: CM5a; 7:CM5b.

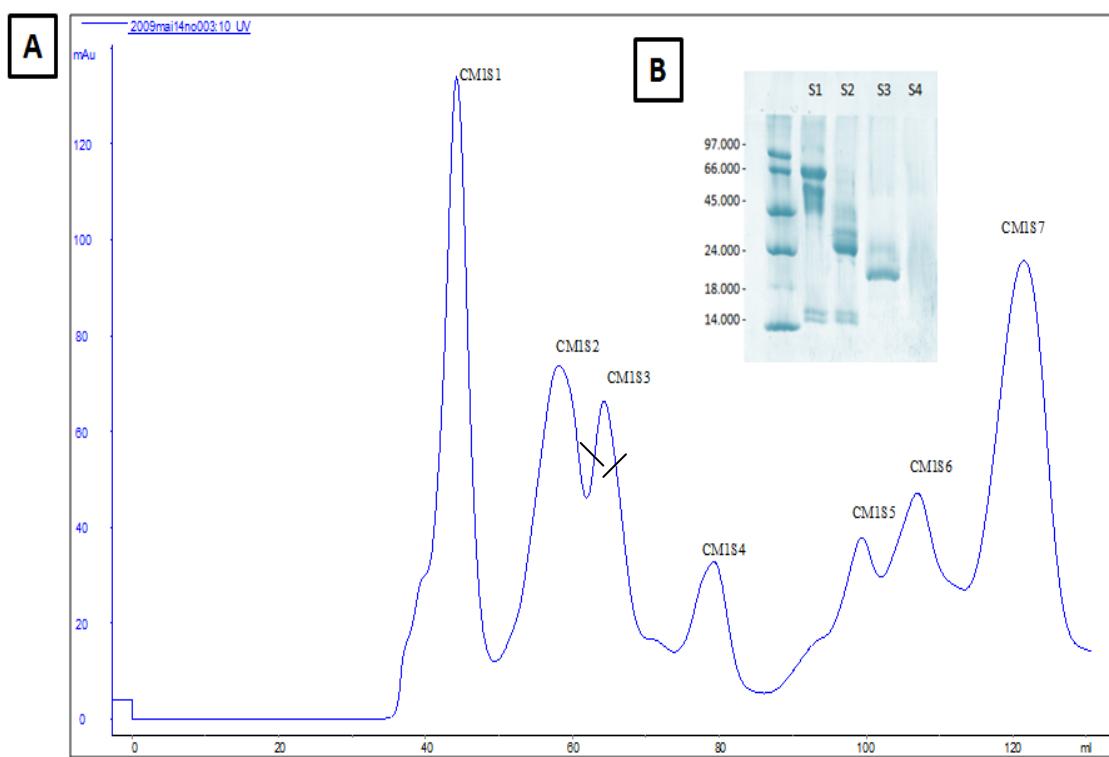


Figura 2: (A) Perfil cromatográfico da fração CM1 (40mg) em coluna de gel filtração Sephadryl S300 previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8. Frações de 1mL/tubo foram coletadas com um fluxo de 0,2mL/min a temperatura ambiente, em seguida foram liofilizadas e armazenadas -20ºC. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%. 1: MW (Padrão de massa molecular); 2: CMS1; 3: CMS2; 4: CMS3; 5: CMS4.

A fração CM1S3 foi testada quanto à atividade azocaseinolítica (**Tabela I**) e em seguida foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em coluna Capto Q previamente equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,8 (**Figura 3A**). Nessa etapa cromatográfica, dentre os picos de A_{280nm} obtidos, o pico majoritário (**Figura 3A**) continha a proteína de interesse. Este foi posteriormente liofilizado e visualizado em SDS-PAGE a 12,5% em condições redutoras (**Figura 3B**) demonstrando ser homogêneo e com massa molecular próxima à 23kDa. Assim, esta proteína foi denominada de BpMPII, a qual representou 0,3% da peçonha total, bem como apresentou atividade proteolítica satisfatória sobre a azocaseína quando comparada a peçonha bruta e demais

frações (**Tabela 1**). Esta amostra foi posteriormente aplicada em uma coluna de fase reversa (C18/RP-HPLC) (**Figura 4**) para ser utilizada nos experimentos de MALDI-TOF e sequenciamento por MS/MS.

As análises da massa por MALDI-TOF apresentaram uma proteína de 23kDa (**Figura 5**). O pl da BpMP-II foi determinada utilizando eletroforese bidimensional revelando um valor de 6,1.

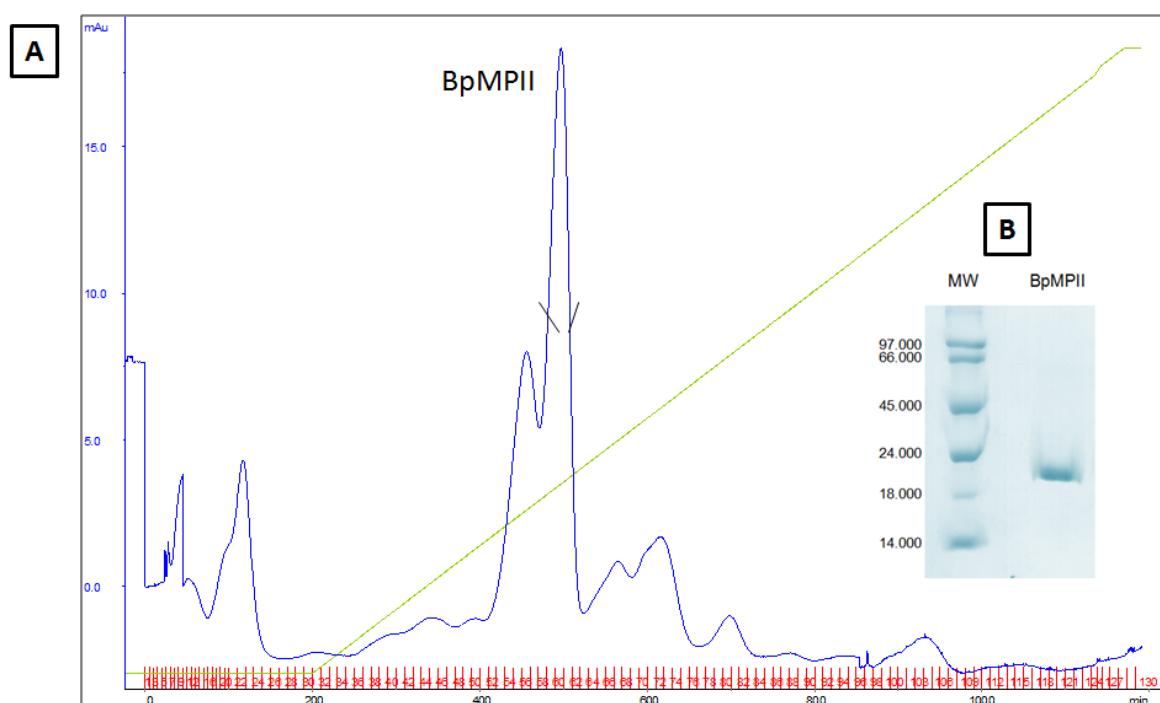


Figura 3: (A) Perfil cromatográfico da fração CM1S3 (11mg) em coluna de troca-iônica Capto Q. A coluna foi equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8 e o gradiente foi realizado utilizando o mesmo tampão 0,5M, pH 7,8. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE; Poço 1: Padrão de massa molecular (MW), BpMPII (10ug) reduzida com β -mercaptoetanol.

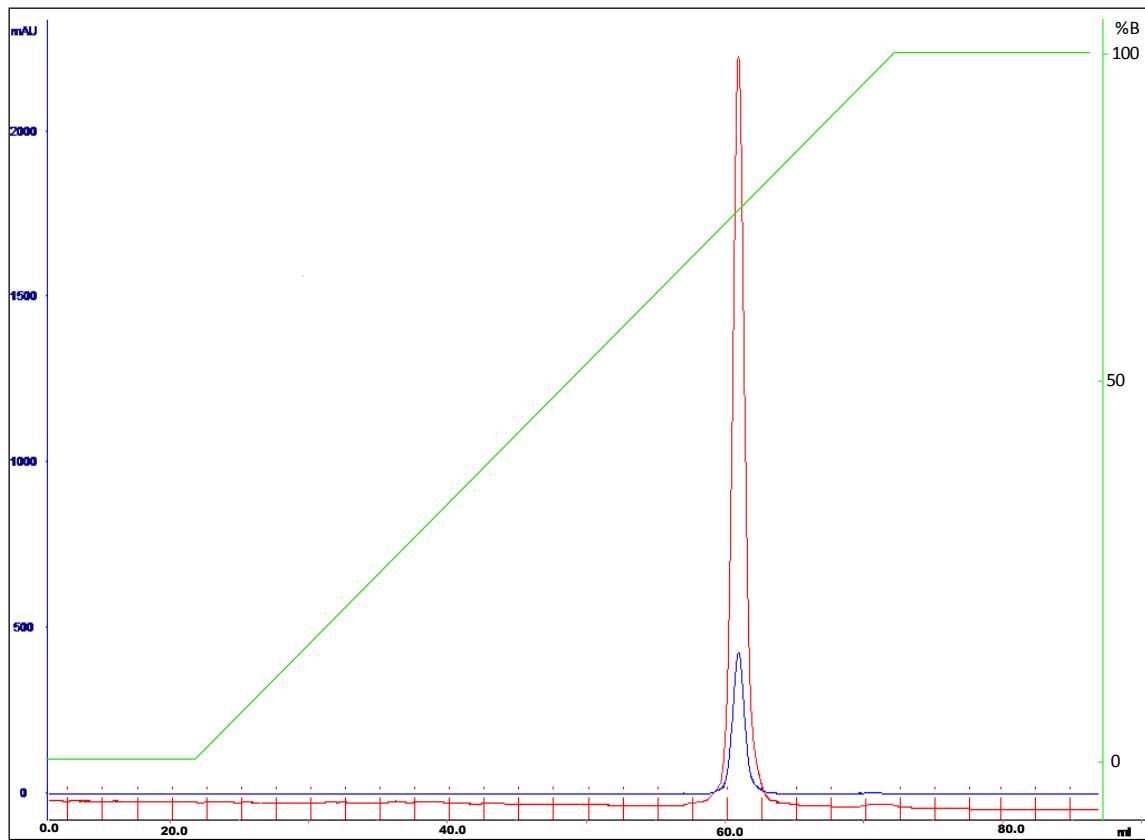


Figura 4: Perfil cromatográfico da BpMP-II submetida à cromatografia líquida de alta performance em coluna de fase reversa C18 (HPLC-RP). Gradiente linear com acetonitrila 80%. Leitura realizada a 280nm (traçado azul) e 514nm (traçado vermelho).

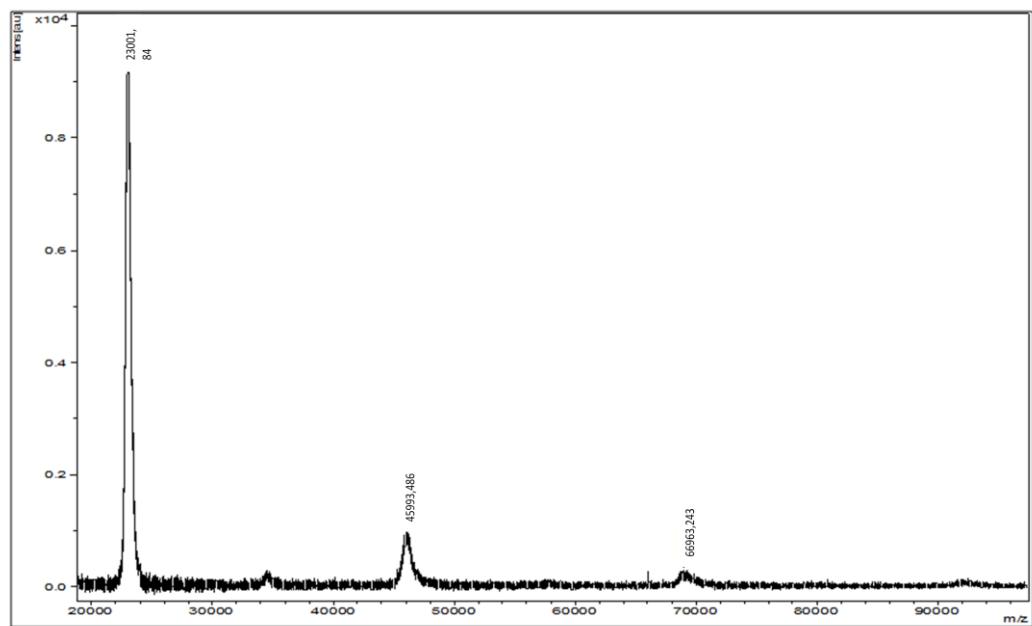


Figura 5: Perfil da espectrometria de massa da BpMP-II; Protease com 23.001 Da. Outros picos são dímeros e trímeros da mesma proteína.

Tabela 1 – Rendimento proteico e atividade enzimática

Etapas de purificação	Quantidade (mg/totais)*	Recuperação Protéica (%)	Atividade Azocaseinolítica (U/mg)**
Peçonha bruta	200	100	1700
CM1	40	20	1240
CM1S3	11	5,5	1010
BpMP-II	0,55	0,3	1110

* Dosagem realizada pelo metodo de Bradford (1974).

**1U representa o aumento na variação de 0,01 de absorbância (405nm) que a enzima hidrolisa o substrato (azocaseína).

3.1.2 Sequenciamento parcial da BpMPII por MS/MS

O sequenciamento parcial da BpMPII foi realizado por spectrometria de massas. Cerca de 100µg da proteína foi submetida a hidrólise com a Tripsina (item 2.7.1.) e o espectro de fragmentos (**Figura 6**) obtidos foi analisado pelo software *Biotools* e a identificação da proteína foi realizada com o software *Matrix Science (Mascot Search Results)*. Para a identificação da proteína os peptídeos de massa 1096.509, 1549.669 e 1822.743 Da foram fragmentados pelo método LIFT para obtenção do Ms2 (MALDI TOF-TOF). O score gerado a partir dessa análise foi de 110 (sendo significativo a partir de 50 e p<0,05) (**Figura 7**) mostrando uma elevada similaridade com outras SVMPs incluindo o precursor de metaloprotease I (MPI) presente na biblioteca de cDNA de *B. neuwiedi* (**Figura 8**).

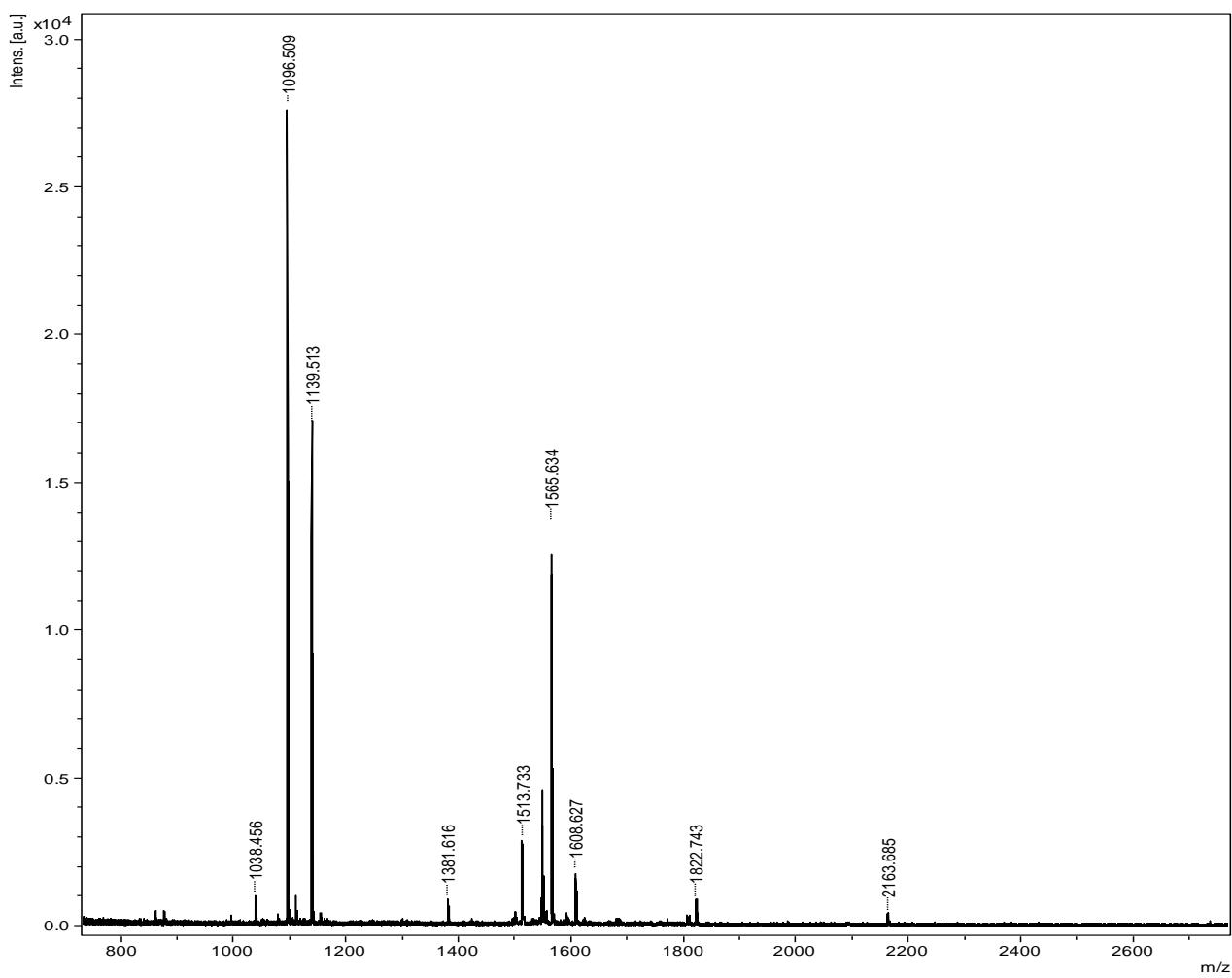


Figura 6: Espectro Ms1 do perfil de massas dos peptídeos obtidos a partir da fragmentação da proteína BpMP-II com tripsina. Análise dos espectros foi feita com o software Biotools (Bruker Datomics) e os valores são apresentados em Da.

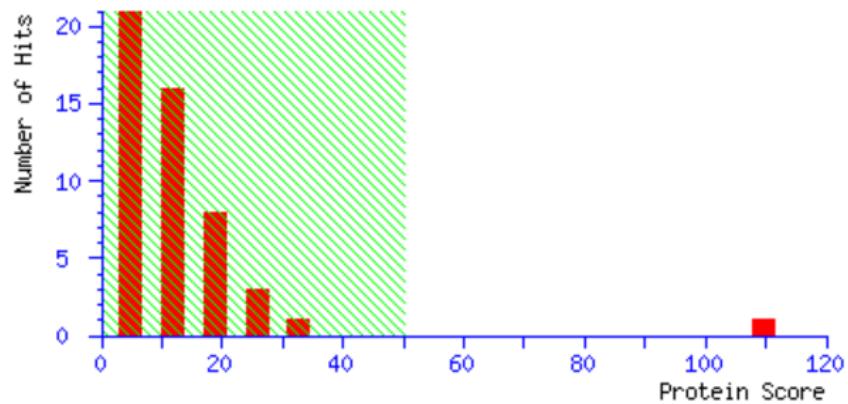


Figura 7: Histograma mostrando o score altamente significativo acima de 50 ($p < 0,05$), o que indica a confiabilidade dos resultados obtidos pela fragmentação em MS/MS.

BPMP-II	RTRVHEMVNTVNGFFR
BPMP-I	YIELAVVADHGMFT-KYNSNVNTI-----RTWVHEMVNSLNGFFR
MP-I PRECURSOR	KMCGVTETNWESYEPIKKASQSNTPEQQRFSPRYVELAVVADNGMFT-KYNSNLNTI-----RTRVHEMVNTVNGFFR
BnP1	SQIKFKPSYIELAVVADHGMFT-KYNSNINTI-----R-IVHEMVNTVDGFFR
BPMP-II	S-----KTLTSFGEWRER-----
BPMP-I	SMXVDASLVNLEVWSK-----TLTSFGEWR--DLLPRISHDHAQLLTTIVFDQQTIGIAYTAGMCDPSQSVAV
MP-I PRECURSOR	SMNVDASLANLEVWSKKDLIKVEKDSSKTLTSFGEWRERD DLLPRISHDHAQLLTTIVFDQQTIGMAYTAGMCDPSQSVAV
BnP1	T-----ITSFGEWRERDIIP-----
BPMP-II	VMDH-----VAVTMAHELGHNLGMDHDDTCTCGAKSCIMASTISKGLSFEFSDCSQNQYQTYVTKHNPQCILNK-----
BPMP-I	VMDHSKKNIRVAVTMAHELGHNLGMDHDDTCTCGAKSCIMASTISKGLSFEFSDCSQNQYQTYVTKHNPQCILNKPLLT
MP-I PRECURSOR	RSCIMASTISK-----HNPOCIINQPI-----
BnP1	
BPMP-II	-----
BPMP-I	-----
MP-I PRECURSOR	SGNELLEAGE
BnP1	-----

Figura 8: Alinhamento da sequência parcial da BpMPII com algumas sequências homólogas à metaloproteases PI obtidas do banco de dados de proteínas do BLAST (PubMed-Medline) e do Uniprot: Códigos de acesso: Precursor da MP-I da peçonha de *Bothrops neuwiedi* (ADO21504); BnP1 da peçonha de *Bothrops neuwiedi* (P0C6S0) (BALDO et al., 2008).

3.2 Caracterização enzimática e bioquímica

A toxina BpMP-II foi submetida ao teste de atividade azocaseinolítica (**Figura 9**) e verificou-se que a atividade foi dose-dependente. A partir desse resultado foram utilizados 5 μ g de BpMP-II para verificar a estabilidade da protease em diferentes pHs e sua termolabilidade uma vez que nessa concentração a protease apresentou atividade significante. Observou-se que a protease BpMP-II perdeu totalmente sua atividade a 60°C e 100°C e apresentou atividade ótima a 4°C (**Figura 10**). Em soluções com pH 2,5 e 5,0 a protease diminuiu sua atividade proteolítica sobre a azocaseína. Em pH 7,5 a atividade foi máxima e sofreu uma leve queda ao ser incubada em tampão borato 50mM (pH 10,5) (**Figura 11**).

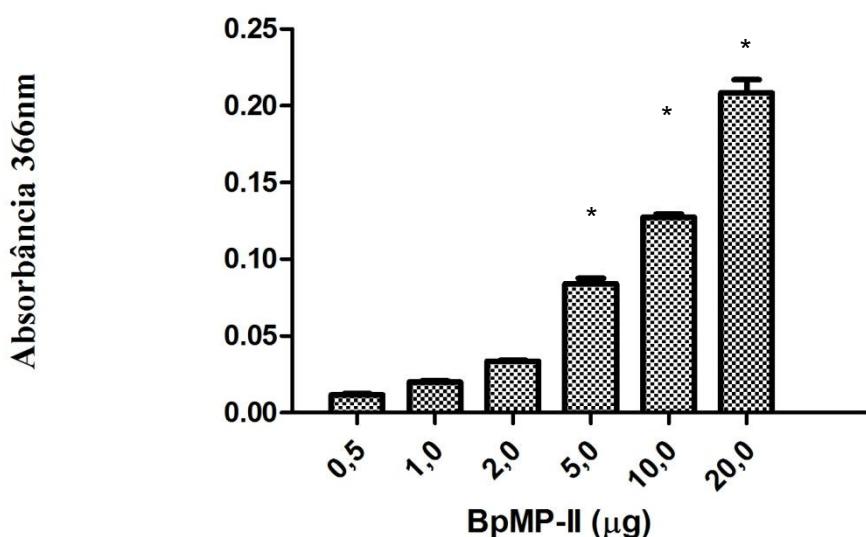


Figura 9: Atividade proteolítica da BpMP-II sobre a azocaseína. Diferentes doses de BpMP-II foram incubadas com 160 μ L de azocaseína a 37°C por 30 minutos; a reação foi interrompida com a adição de 45 μ L de solução de ácido tricloroacético 20%.

Resultados são apresentados com média e desvio padrão (n=3). (*) significância p<0,05.

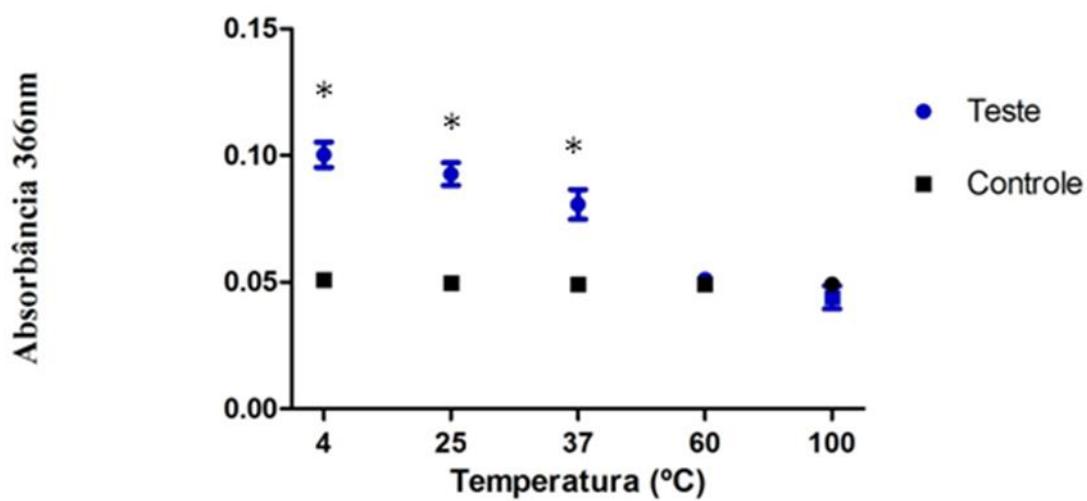


Figura 10: Atividade azocasenolítica da enzima BpMP-II. 5 μ g da BpMP-II foram pré incubadas com azocaseína em diferentes temperaturas (4°C; 25°C; 37°C; 60°C e 100°C). A atividade enzimática foi maior quando BpMP-II foi incubada a 4°C. A 60°C e 100°C a protease perde sua atividade. Resultados são apresentados com média e desvio padrão ($n=3$) (*) significância $p<0,05$.

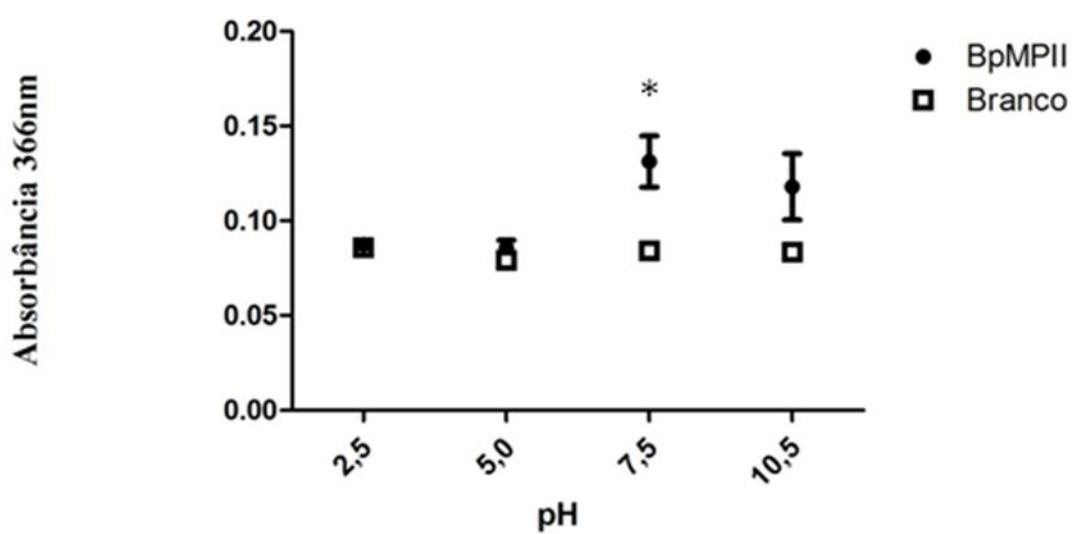


Figura 11: Atividade proteolítica de BpMP-II sobre a azocaseína em soluções de diferentes pHs. A Metaloprotease BpMP-II apresentou um pico de atividade azocaseinolítica em solução pH 7,5 e perdeu atividade em pHs ácidos (pH 2,5 e pH 5,0). Resultados são apresentados com média e desvio padrão ($n=3$) (*) significância $p<0,05$.

3.2.1 Atividade Fibrinogenolítica

A metaloprotease BpMP-II apresentou atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino (**Figura 12A**) de forma dose-dependente. Os resultados de atividade fibrinogenolítica demonstraram que apenas 2 μ g de BpMP-II foram suficientes para degradar a cadeia A α do fibrinogênio porém nenhuma das concentrações foram suficientes para degradar cadeia B β , em 1 hora de incubação. Baseando-se nesses resultados foi utilizada a concentração de 5 μ g para os demais testes de atividade fibrinogenolítica. A hidrólise total da cadeia A α ocorreu com 15 minutos de incubação da protease com o fibrinogênio. Apenas com 24 horas de incubação a BpMPII foi capaz de degradar também a cadeia B β do fibrinogênio (**Figura 12B**). Os ensaios de inibição da atividade fibrinogenolítica induzida pela BpMP-II, revelaram que esta foi completamente inibida quando previamente incubada com EDTA, 1,10-fenantrolina β -mercaptoetanol e (**Figura 12C**). Nos dois primeiros casos a BpMP-II mostrou dependência para Zn $^{++}$, uma vez que foi inibida na presença de EDTA e 1,10-fenantrolina que são quelantes do metal Zn $^{++}$ presente no domínio catalítico. A perda de atividade na presença de β -mercaptoetanol está relacionada com a perda de sua conformação proveniente da quebra das pontes dissulfetos. Inibidores específicos para serinoproteases, benzamidina e aprotinina, não foram capazes de inibir a atividade proteolítica. Todos os ensaios tiveram seus resultados analisados em gel de eletroforese SDS- PAGE 12,5%.

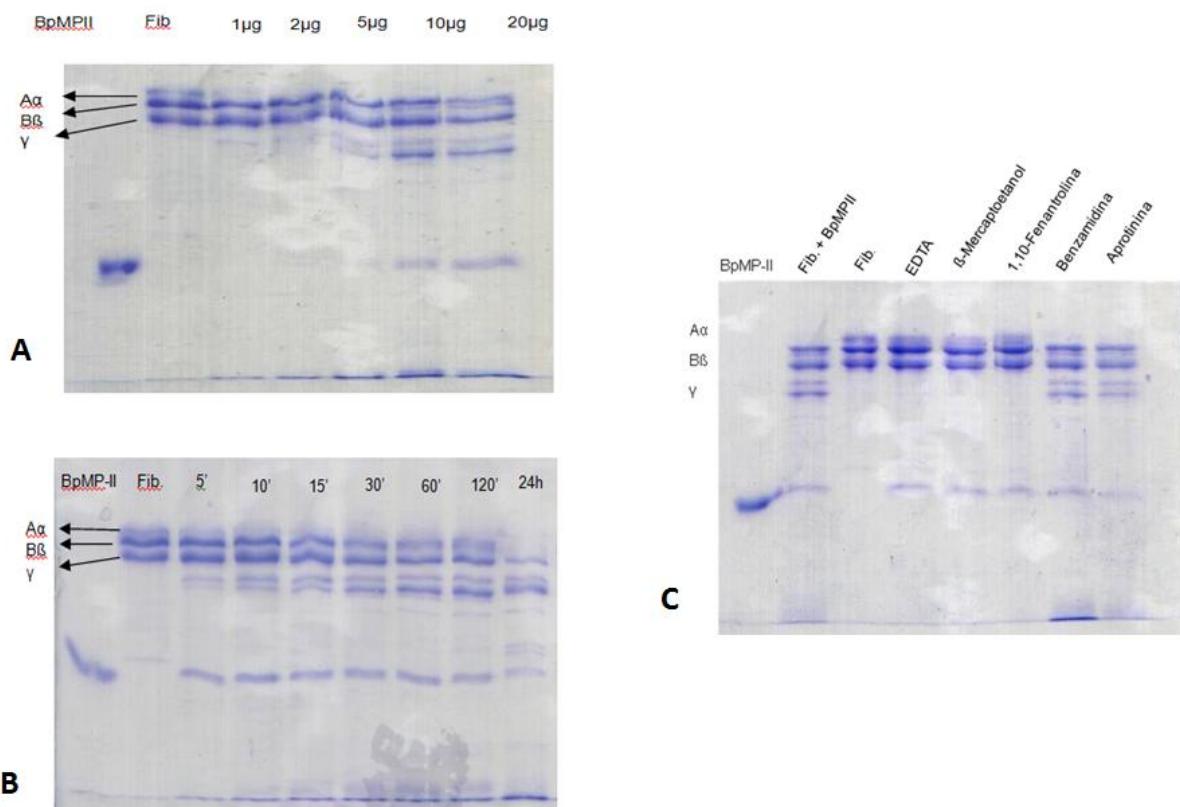


Figura 12: Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) dos produtos de degradação da atividade fibrinogenolítica da BpMP-II sobre o fibrinogênio em diferentes condições experimentais. (A): Diferentes concentrações de BpMP-II foram incubadas com 50 μ L de fibrinogênio bovino (1mg/mL) a 37°C por 1h. (B) Tempo dependente: BpMP-II (5 μ g) incubados com 50 μ L de fibrinogênio bovino (1mg/mL) a 37°C. (C) Presença de inibidores de proteases: 5 μ g de BpMP-II foram pré-incubados com diferentes inibidores por 1h a 37°C, posteriormente foram adicionados 50 μ L de fibrinogênio bovino (1mg/mL) e incubados por 1h a 37°C. Controles: Fib. (10 μ L de fibrinogênio a 1mg/mL) e BpMP-II (5 μ g).

3.3 Caracterização Biológica

3.3.1 Teste de citotoxicidade por MTT

A citotoxicidade das metaloproteases BpMP-I e BpMP-II sobre células endoteliais murinas (tEnd) foi avaliada pelo método MTT (**Figura 13**). As

células tEnd foram incubadas com diferentes concentrações e após 24h de tratamento, observou-se que a BpMPII induziu alteração na viabilidade das células com a concentração de 20 μ g/mL, com redução de aproximadamente 45% da viabilidade celular (**Figura 13A**). Já a BpMP-I não induziu citotoxicidade em células tEnd (**Figura 13B**).

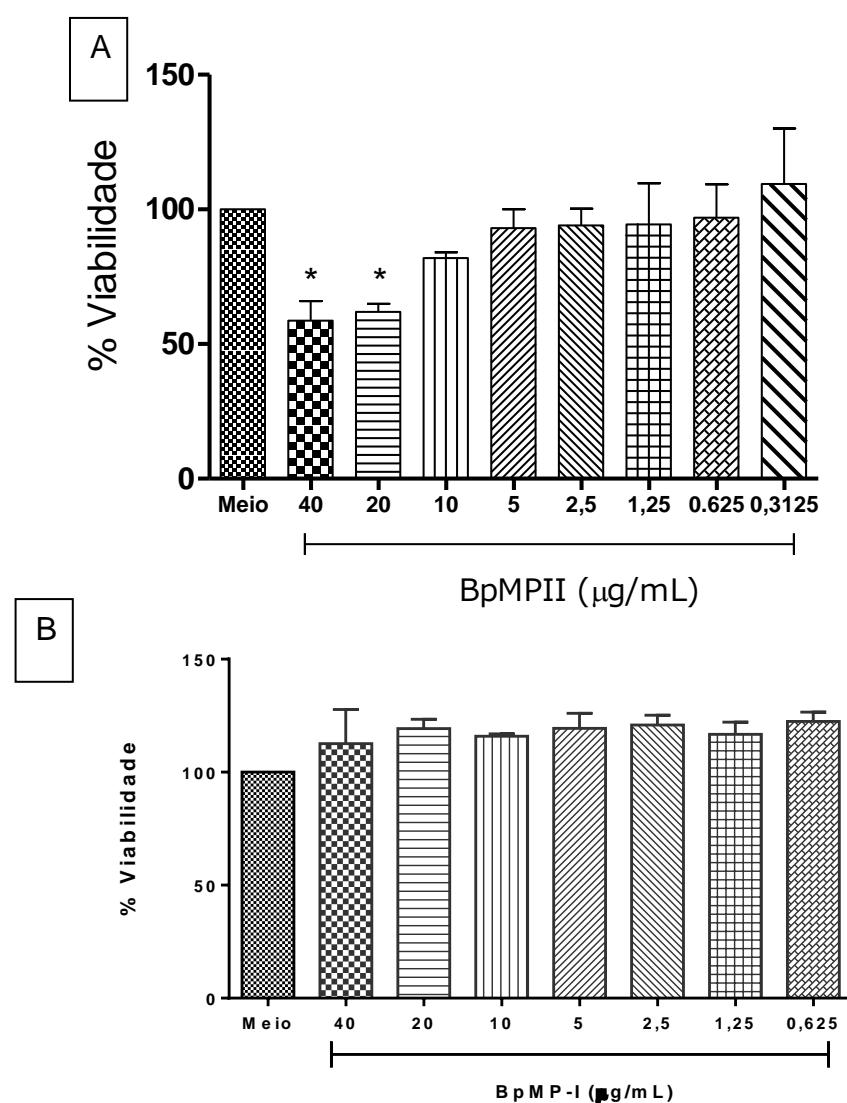


Figura 13: Gráfico de viabilidade de células tEnd quando incubadas com diferentes concentrações de BpMP-II e de BpMP-I. (A) 20 μ g/mL da metaloprotease BpMP-II foi capaz de diminuir a viabilidade celular em 45%. (B) Diferentes concentrações de BpMP-I não foram suficientes para diminuir a viabilidade desse tipo

celular. A viabilidade celular foi determinada de acordo com o descrito em Material e Métodos. As amostras foram analisadas em triplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (meio de cultura).

3.3.2. Teste de miotoxicidade por dosagem de Creatina Cinase (CK)

BpMP-II induziu baixa miotoxicidade no músculo gastrocnêmio de camundongos quando comparado com os níveis plasmáticos de CK do grupo controle injetado com PBS (Figura 14) e também não causou hemorragia quando injetada por via intradérmica no dorso de camundongos (resultados não apresentados).

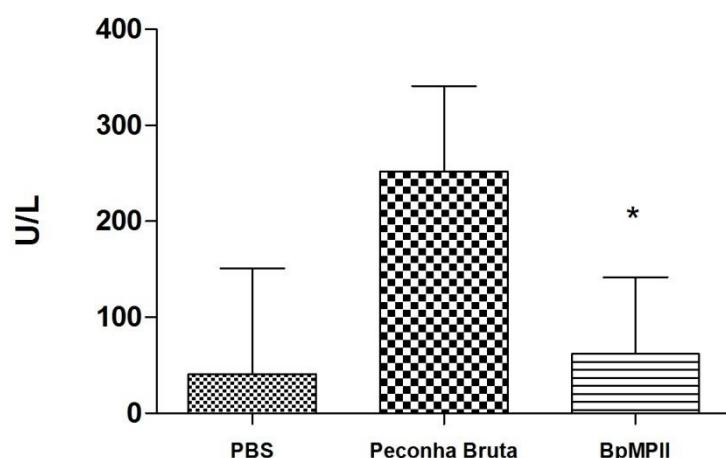


Figura 14: Gráfico da dosagem de creatina cinase (CK) em camundogos tratados com PBS (controle negativo), 10 μ g de peçonha bruta (controle positivo) e 20 μ g da enzima BpMP-II (Teste). As amostras foram analisadas em triplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (Peçonha bruta). A diferença entre o teste e o controle negativo não foi significativa.

4.0. DISCUSSÃO

A metaloprotease BpMP-II isolada e caracterizada nesse trabalho foi obtida a partir de uma análise que objetivava encontrar um composto presente

na peçonha de *B. pauloensis* com atividade enzimática, seguindo um protocolo de purificação bem conhecida e padronizada pelo nosso grupo de estudo.

No primeiro passo cromatográfico em coluna de troca iônica CM-Sepharose (**Figura 1A**) foi possível determinar atividade azocaseinolítica do pico CM1. Outras frações obtidas nesse passo cromatográfico apresentam atividade enzimática, como o pico CM3 de onde foi isolada a metaloprotease BpMP-I (NAVES, 2012). Por apresentar alta atividade enzimática e conter vários compostos, como mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida (**Figura 1B**), a fração CM1 foi recromatografada em coluna de filtração Sephacryl S-300 (**Figura 2A**), a fim de isolar o composto, ou um dos compostos, responsável (eis) por essa atividade. Com esse resultado, concluiu-se que a fração CM1 continha pelo menos sete compostos de diferentes massas moleculares. Um dos picos obtidos (CM1S3) manteve atividade azocaseinolítica (**Tabela 1**), sendo então coletado, liofilizado e em seguida submetido à cromatografia em coluna de troca iônica HiTrap Capto-Q (aniônica) (**Figura 3A**). A homogeneidade da fração obtida do último passo cromatográfico, denominada BpMPII foi confirmada por cromatografia em HPLC utilizando coluna C18 (**Figura 4**). O pico majoritário corresponde à metaloprotease BpMP-II que apresentou rendimento de 0,3% em relação à peçonha bruta. A Bothropoidin, uma metaloprotease da classe PIII isolada da peçonha de *B. pauloensis* também apresentou uma recuperação de 0,34% (GOMES, 2013). Esse baixo rendimento das metaloproteases isoladas de *B. pauloensis* pode ser explicado pela grande diversidade dessas proteases presentes nessa peçonha (RODRIGUES *et al.*, 2012). Embora as SVMPs representem uma das maiores frações das peçonhas botrópicas, quando isoladas podem apresentar baixo rendimento (PETRAS *et al.*, 2011).

BpMP-II apresentou massa molecular de 23,8kDa quando analisada em gel SDS-PAGE 12,5%. A massa real da proteína foi de 23.001 Da e foi determinada pela análise em espectrometria de massas (MALDI-TOF) (**Figura 5**). Essa diferença entre as massas obtidas por eletroforese em SDS-PAGE 12.5% e por espectrometria de massas pode ser explicada pela maior precisão da segunda técnica, refletindo melhor a massa real da proteína.

A caracterização estrutural permitiu concluir que a sequência da BpMP-II apresentou similaridade estrutural com o precursor da MP-1b, de *B. neuwiedi*

(MOURA-DA-SILVA, 2011), e também com outras metaloproteases denominadas BnP1 e BnP2 de *B. neuwiedi* (BALDO *et al.*, 2008), ambas pertencentes à classe PI das metaloproteases (**Figura 8**). A similaridade entre MP-1b e BpMP-II provavelmente está relacionada com o ancestral comum presente entre as serpentes do complexo *Bothrops neuwiedi* (AMARAL, 1925).

O complexo *Bothrops neuwiedi* foi descrito inicialmente como sendo um complexo composto por 12 subespécies, todas com ampla distribuição na América do Sul. Silva (2000) elaborou uma reclassificação taxonômica e elevou sete subespécies à categoria de espécie dentre elas a espécie *B. pauloensis*. Posteriormente, baseando-se em aspectos moleculares como análise do DNA mitocondrial, Fenwick e colaboradores (2009) propuseram uma nova classificação para o gênero *Bothrops*. Nessa reclassificação surgiram novos gêneros como *Rhinocerophis*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias* e *Bothropoides*. Esse último contendo a espécie *Bothropoides pauloensis* inicialmente descrita como *Bothrops pauloensis* (SILVA e RODRIGUES, 2008; FENWICK, 2009). Porém essa classificação não foi bem aceita pela Sociedade de Herpetologia voltando a classificação anterior.

O substrato azocaseína foi utilizado para se caracterizar as propriedades enzimáticas de BpMP-II frente a diferentes condições de temperatura, pH e concentração da enzima. BpMPII apresentou alta atividade em diferentes concentrações (**Figura 9**) e a dose de 5 μ g foi padronizada para os demais ensaios enzimáticos. Quanto à influência da temperatura na atividade concluiu-se que em temperaturas elevadas (37°C, 60°C e 100°C) a protease perdeu sua atividade por, provavelmente, sofrer degradação. Em baixas temperaturas a atividade é significativamente alta (**Figura 10**). No teste de atividade enzimática sobre a azocaseína em diferentes pHs (**Figura 11**) a metaloprotease BpMP-II comportou-se semelhantemente às demais SVMPs que apresentam uma atividade ótima próximo ao pH neutro (MANNING, 1995; XU *et al.*, 2004). Estes resultados foram demonstrados para outras proteases dessa classe como a neuwiedase (RODRIGUES *et al.*, 2000). A acutolisina-A (SVMP da classe PI isolada de *Agkistrodon acutus*), apresentou decréscimo da atividade proteolítica quando em pH 3 (ZHU *et al.*, 1997). A SVMP BpMP-I foi caracterizada como apresentando alta atividade azocaseinolítica em baixas temperaturas e teve sua

atividade reduzida quando incubada em pH ácido (NAVES, 2012). A perda de atividade está relacionada com alteração no resíduo Glu177 (essencial à catálise) e com o estado de protonação dos resíduos de His presentes no sítio ativo. A protonação dos resíduos ligados à catálise da metaloprotease altera a afinidade do sítio da molécula pelo zinco (Zn^{++}) interferindo nas atividades que são zinco-dependentes (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

As enzimas fibrinogenolíticas presentes nas peçonhas de serpentes podem ser classificadas de acordo com a especificidade por hidrolisar as cadeias do fibrinogênio. As enzimas com afinidade pela cadeia $A\alpha$ do fibrinogênio, como a SVMP BpMP-II, são denominadas de α -fibrinogenases, enquanto que as proteases responsáveis por clivar a cadeia $B\beta$ são classificadas como β -fibrinogenase. A proteólise altera o reconhecimento pela trombina impossibilitando a correta clivagem do fibrinogênio para a formação da fibrina (SWENSON e MARKLAND, 2005). A metaloprotease BpMP-II apresentou-se com alta atividade fibrinogenolítica inclusive em baixas concentrações ($2\mu g$) (**Figura 12A**). Essa atividade foi inibida por EDTA e 1,10-fenantrolina que comprova a dependência do metal zinco para a BpMP-II exercer sua atividade catalítica. O agente β -mercaptoetanol também inibiu a atividade fibrinogenolítica por alterar a conformação estrutural da proteína pela quebra das pontes dissulfeto (**Figura 12C**). Dessa forma, a metaloprotease mostrou ter maior afinidade pela cadeia $A\alpha$ e uma leve afinidade pela cadeia $B\beta$, que foi degradada quando incubado o fibrinogênio com BpMP-II por 24h (**Figura 12B**). A BpMPII também mostrou ser inibida por inibidores de metaloprotease e não por inibidores de serinoproteases (benzamidina e aprotinina). A BpirMP é um exemplo de metaloprotease da classe PI com atividade fibrinogenolítica e atividades trombolíticas (BERNARDES, et al., 2013). Resultados apresentados por Naves (2012) em relação à metaloprotease BpMP-I foram similares aos resultados obtidos em BpMP-II. BpMP-I apresentou afinidade pela cadeia $A\alpha$ e foi inibida por EDTA, 1,10-fenantrolina e β -mercaptoetanol. Outras SVMPs da classe PI apresentam resultados similares (BERGER, et al.; 2008; TORRES-HUACO et al., 2010; SANCHEZ et al., 2010). A coagulopatia é um efeito bastante conhecido que ocorre no envenenamento botrópico. Essas alterações são causadas por essas enzimas serem capazes de degradar fibrinogênio e ou

fator de vonWillebrand e dessa forma interferirem na hemostasia. Algumas das proteínas fibrinogenolíticas têm sido utilizadas clinicamente como anticoagulantes ou estão em fase de investigação para uma possível aplicação terapêutica (BRAUD et al, 2000; LEWIS & GARCIA, 2003; MARSH, 2001).

Células endoteliais são importantes alvos das SVMPs, pois diversas metaloproteases podem interferir na viabilidade e adesão dessas células. As SVMPs podem induzir apoptose em células endoteliais por mecanismos catalíticos, clivando proteínas de matriz extracelular (colágeno, laminina, nidogênio, etc.), interagindo ou degradando integrinas de superfície de membranas que estão envolvidas em processos de adesão, migração e comunicação celular. Portanto, a apoptose induzida por SVMPs pode estar relacionada com a capacidade proteolítica e ou anti-adesiva dessas enzimas (FORMESYN et al., 2013).

A metaloprotease BpMP-II induziu diminuição da viabilidade celular com as concentrações de 20 e 40 μ g/mL (**Figura 13A**). Isto pode ser explicado pela ação proteolítica exercida pela BpMP-II sobre proteínas de membrana responsáveis pela adesão das células tEnd. O mecanismo de ação, diferentemente das desintegrinas, ou SVMPs da classe PIII que possuem o domínio *desintegrina-like* não está envolvido com a competição por integrinas de membranas uma vez que metaloproteases da classe PI não apresentam o motivo de ligação RGD. Diferentemente, a metaloprotease BpMP-I não promoveu citotoxicidade em tEnd (**Figura 13B**) nas mesmas condições experimentais. Sugere-se que a capacidade citotóxica da BpMPII, isolada no presente estudo, esteja relacionada à degradação proteolítica e ou interação à alvos específicos presentes na membrana de células tEnd. No entanto, novos estudos deverão ser traçados a fim de melhor elucidar este mecanismo de ação.

Apesar da citotoxicidade *in vitro* de BpMP-II, esta apresentou uma baixa atividade miotóxica quando inoculada em músculo gastrocnêmio de camundongos e não foi capaz de induzir hemorragia quando injetada intradermicamente no dorso de camundongos (resultados não mostrados) (**Figura 14**). A baixa toxicidade de SVMPs PI é bem descrito na literatura (RODRIGUES et al., 2001; NAVES et al., 2012; OYAMA et al., 2013). Baldo e

colaboradores (2010) demonstraram que a metaloprotease Neuwiedase apresenta baixa hemorragia e baixa miotoxicidade.

A baixa ou ausência de atividade hemorrágica é característica de SVMPs pertencentes à classe PI, ainda assim, pode-se observar leve miotoxicidade em alguns casos. Isso mostra que a miotoxicidade nem sempre está relacionada à isquemia proveniente da hemorragia, mas pode ser resultado de uma ação direta da metaloprotease sobre as células musculares (BALDO *et al.*, 2010).

5.0. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi demonstrado o isolamento e a caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease PI de *Bothrops pauloensis*. De acordo com suas características bioquímicas e enzimáticas, a BpMP-II pode ser incluída na classe das metaloproteases fibrinogenolíticas, anticoagulantes, citotóxica e não hemorrágica. Tais resultados abrem perspectivas para a utilização da BPMP II como potencial terapêutico a ser explorado em trabalhos futuros.

6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDO, C.; IZIDORO, L. F. M. ; FERRO, E. A. V. ; HAMAGUCHI, A. ; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. ; Rodrigues, Veridiana M. . Action of neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom, on skeletal muscle: an ultrastructural and immunocytochemistry study. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (Online)**, v. 16, p. 462-469, 2010.

BALDO, C., TANJONI, I., LEON, I.R., BATISTA, I.F.C., DELLA-CASA, M.S., CLISSA, WEINLICH R., LOPES-FERREIRA M., LEBRUN I., AMARANTE-MENDES G.P., RODRIGUES V.M., PERALES J., VALENTE R.H., MOURA-DA-SILVA A.M.; "BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP."; **Toxicon** 51:54-65, 2008.

BERNARDES, C.P.; MENALDO, D.L.; CAMACHO, E.; ROSA J.C.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; LOMONT, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; SAMPAIO, S.V. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. **Journal of proteomics**; 80,250–267, 2013.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemoragic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, p.325-372, 1994.

BRAUD, S.; BOM, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v.82, p 851-859, 2000.

BUSSOLINO F, DE ROSSI M, SICA A, ET AL. Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. **J Immunol**; 147: 2122–2129; 1991.

CRUZ, L.S.; VARGAS, R.; LOPES, A.A. Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethnicity & Disease**, v. 19, p. 41-46, 2009.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L.; Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009.

FORMESYN, E.M., HEYNINCK, K., DE GRAAF, D.C. The role of serine- and metalloproteinases in *Nasonia vitripennis* venom in cell death related processes towards a Spodoptera frugiperda Sf21 cell line. **J Insect Physiol**. May 15. doi:pii: S0022-1910(13)00117-0. 10.1016/j.jinsphys.2013.05.004, 2013.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and

their contribution to venom complexity. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**, v.275, p 3016-3030, 2008.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotoxin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v.45, p 969-985, 2005.

GOMIS-RÜTH, F.X. Structural aspects of the *metzincin* clan of metalloendopeptidases. **Mol. Biotechnol.** 24, 157 – 202; 2003.

GOMIS-RÜTH, F.X., BOTELHO, T.O., AND BODE, W. A standard orientation for metallopeptidases. **Biochim. Biophys. Acta** 1824, 157 – 163; 2012.

GUTIÉRREZ JM, LOMONTE B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. **Mem inst butantan**; 33:1405-74, 1995.

KAMIGUTI, A.S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 1041-1049, 2005.

LEWIS, R.J., GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature reviews. Drug Discovery**, v. 2, p.790-802, 2003.

MANNING, M.C. Sequence analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from *Akistodon contortrix contortrix*. **Toxicon**, v. 33, p. 1189-1200, 1995.

MARSH, N.A. Diagnostic uses of snake venom. **Haemostasis**, v.31, p. 211 217, 2001.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta: BBA** 1477, 146-156. 2000.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; FURLAN, M.S.; CAPORRINO, M.C.; GREGO, K.F.; PORTES-JUNIOR, J.A.; CLISSA, P.B.; VALENTE, R.H.; MAGALHÃES, G.S. Diversity of metalloproteinases in *Bothrops neuwiedi* snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. **BMC Genetics** 2011.

NAVES, D.L.S.; GOMES, M.S.R.; FERREIRA, F.B.; RODRIGUES, R.S., ACHÉ, D.C., RICHARDSON, M.; BORGES, M.H.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B** 161, 102–109, 2012.

OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI BRANDEBURGO, M. I. Purification and characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (caissaca). **Biochemistry Molecular Biology International**, v. 47, p. 1069-1077, 1999.

OYAMA, E., KITAGAWA, Y., TAKAHASHI, H. Primary structure and characterization of a non hemorrhagic metalloproteinase with fibrinolytic activity, from the snake venom of *Protobothrops tokarensis* (Tokara-habu). **Toxicon**. May 11;70C:153-161. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.04.004, 2013.

PETRAS, D., LIBIA SANZ, ALVARO SEGURA, MARÍA HERRERA, MAUREN VILLALTA, DANIELA SOLANO, MARIANGELA VARGAS, GUILLERMO LEON, DAVID A. WARRELL, R. DAVID G. THEAKSTON, ROBERT A. HARRISON, NANDUL DURFA, ABDULSALAM NASIDI, JOSE MARÍA GUTIERREZ, J.J. CALVETE. Snake Venomics of African Spitting Cobras: Toxin Composition and Assessment of Congeneric Cross-Reactivity of the Pan-African EchiTAB-Plus-ICP Antivenom by Antivenomics and Neutralization Approaches. **J.Proteome Res.**, 10, 1266 – 1280; 2011.

RUCUVADO, A; ESCALANTE, T; TEIXEIRA, C.F; FERNANDES, C.M; DIAZ, C; GUTIERREZ, J.M. Incrementes in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damagin toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators Inflamm.** v.11, p 121-128, 2002.

RAMOS, O.H.P; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Snake venom metalloprotease structure and function of catalytic and desintegrin domains. **Comparative biochemistry and Physiology – parte C** 142, p 328-346, 2006.

RODRIGUES,V.M., SOARES, A. M., GUERRA-SA, R., RODRIGUES, V., FONTES, M. R. M. AND GIGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.381, n. 2, p.213-224, 2000.

RODRIGUES, V.M., SOARES, A.M., ANDRIÃO-ESCARSO, S.H., FRANCESCHI, A.M., RUCAVADO, A., GUTIÉRREZ, J.M., GIGLIO, J.R.. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, 83, pp. 471–479, 2001.

SILVA, V.X. Revisão sistemática do complexo e *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). v.1e 2. Tese (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SILVA, V.X. da,. The *Bothrops neuwiedi* complex, p.410-422. In Campbell, J.A. & Lamar, W.W. (ed.). **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Comstock, Ithaca, London; 2004.

SILVA, V.X.; RODRIGUES, M.T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, n.1, p. 45-90, 2008.

SWENSON, S; MARKLAND JR, F.S. Snake Venom Fibri(ogen)lytic enzymes. **Toxicon**, v.45, p 1021-1039, 2005.

XU, X.L.; LIU, X.H.; WU, B.; LIU, Y.; LIU, W.Q.; XIE, Y.S.; LIU, L.Q. Metal-ion- and pH-induced conformational changes of acutolysin D from *Agkistrodon acutus* venom probed by fluorescent spectroscopy. **Biopolymers**, v. 74, p. 336-344, 2004.

ZHU, X.Y.; ZHU, Z.L.; GONG, W.M.; TENG, M.K.; NIU, L.W. Studies on relationship between the biological activities and circular dichroism of south Anhui *Dienagkistrodon acutus* hemorrhagins. **Sheng Wu Hua Yu Sheng Wu Wu LI Xue Bao** (Shanghai) 29, p. 163-169, 1997.