



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

**ANTI-BpMP-I: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS
POLICLONAIS IgY E IgG ANTI-METALOPROTEASE**

Dayane Lorena Naves de Souza

Orientadora: Prof^a Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

UBERLÂNDIA - MG

2015



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

**ANTI-BpMP-I: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS
IgY E IgG ANTI-METALOPROTEASE**

Dayane Lorena Naves de Souza

Orientadora: Prof^a Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA - MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729a Souza, Dayane Lorena Naves de, 1987-
2015 Anti-BpMP-I: produção e caracterização de anticorpos policlonais
IgY e IgG anti-metaloprotease / Dayane Lorena Naves de Souza. - 2015.
120 f. : il.

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Metaloproteínas - Teses. 3. Anticorpos -
Teses. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
III. Título.

CDU: 577.1



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

**ANTI-BpMP-I: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS
IgY E IgG ANTI-METALOPROTEASE**

Dayane Lorena Naves de Souza

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: _____
Profª Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores: Dra Márcia Helena Borges
Dra Johara Boldrini França
Dr Rafael Nascimento
Dra Bellisa de Freitas Barbosa

Data da Defesa: 13 /11 /2015

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

Profª Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Oração da Paz

Senhor! Fazei de mim um instrumento da vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor.

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.

Onde houver discórdia, que eu leve a união.

Onde houver dúvidas, que eu leve a fé.

Onde houver erro, que eu leve a verdade.

Onde houver desespero, que eu leve a esperança.

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.

Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó Mestre, fazei que eu procure mais:

consolar, que ser consolado;

compreender, que ser compreendido;

amar, que ser amado.

Pois é dando que se recebe.

É perdoando que se é perdoado.

E é morrendo que se vive para a vida eterna.

Dedicatória

À minha família, pelo apoio incondicional que tenho recebido durante a minha vida.

Minha mãezinha querida, Nidalva, não tenho palavras para dizer o quanto a senhora é importante em minha vida. Mamãe, a senhora é o exemplo de vida de muito trabalho e esforço. Além disso, obrigada pela dedicação em cuidar sempre de nós, e apoiar nos em todas as dificuldades. Sou grata a senhora por ter me dado a oportunidade de nascer em seus braços e assim cuidar de mim.

À minha eterna irmãzinha, mesmo sendo maior do que eu, você será sempre minha caçulinha. Obrigada por sempre estar ao meu lado em todas as provações me fortalecendo com seu jeitinho Loyane, amo você incondicionalmente.

Ao meu tio José Roberto, por estar ao meu lado e me auxiliar em todos os momentos. O senhor é exemplo de disciplina e dedicação.

Ao meu titio Ronaldo, por estar ao meu lado em todos os momentos compartilhando minhas conquistas e me amparando nas quedas. O senhor é para mim mais do que um tio. E não existem palavras que assumam o valor que você tem em minha vida. Amo muito o senhor.

À minha vovó Valdete, pelo exemplo mais puro que tive em minha vida. A senhora não demonstrava sua dor, mas sempre um sorriso que era acompanhado de uma força inexaurível. Não existem palavras para agradecer todos os momentos felizes que tive ao seu lado e a saudade que deixou em nossas vidas. E por seu exemplo de vida vozinha espero seguir forte em todas as lutas com a certeza que irei reencontrá-la.

Agradecimentos

Deus obrigada pelo dom da vida, por me amparar nas tribulações necessárias para meu crescimento moral e espiritual. Sua força me guia e auxilia, sempre me fortalece para que eu supere todos os medos. Obrigada meu Pai pelos momentos de felicidade que acalentam meu coração, e por colocar pessoas impares em minha vida.

Ao meu namorado Vinícius por seu amor, companheirismo, auxílio, compreensão, paciência e incentivo. No momento mais tribulado de nossas vidas nos conhecemos, mas estamos aprendendo como vencer cada etapa para que nossos sonhos se concretizem. “Como pode? ”. O caminho que venhamos a trilhar juntos seja repleto de momentos felizes.

Às minhas priminhas amadas, Amanda, Mariana e Alice, sem o amor e carinho de vocês não conseguiria ultrapassar algumas fases. E não há nada mais puro e pleno do que o amor transmitido por vocês. Sou eternamente grata por tê-las em minha vida.

À professora Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, pela orientação durante esses oito anos permeados de muitas conquistas e ensinamentos inimagináveis. Pelo carinho e amizade, que foram essenciais em minha vida. É impossível falar o quanto sou grata a tí pela oportunidade que me concedeu ao me aceitar e incentivar o meu amor pela pesquisa. Obrigada por sempre me incentivar a buscar novas alternativas para solucionar os problemas presentes no dia-a-dia de um laboratório, pelos conselhos ao longo dessa caminhada, e também por me incentivar a vivência em diferentes laboratórios. Veri dizem que ciclos se abrem e fecham constantemente, esse é um deles e uma nova etapa recomeça, mas que nossa amizade perdure por muitos anos.

À professora Dra Eloisa Amália Vieira Ferro, que permitiu a vivência em seu laboratório por aproximadamente um ano, possibilitando que eu conhecesse e aprendesse com um grupo maravilhoso. Obrigada pela disposição que sempre teve em me auxiliar.

À Dra Márcia Helena Borges e a Dra Marta Cordeiro, por me receberem no laboratório da Fundação Ezequiel Dias. Obrigada pela oportunidade de trabalharem com vocês, fui acolhida com muito carinho. Eu tive a oportunidade de aprender muito com vocês e começar a trabalhar e me apaixonar pela espectrometria.

Ao professor Marcelo Bemquerer, pela recepção no período em que estive na EMBRAPA. Obrigada pelo auxílio e o ensino sobre a espectrometria de massas.

Aos meus queridos amigos, Francis, Silveli e Rosane, por estarem ao meu lado em todos os momentos a me apoiarem, incentivarem e acima de tudo, por serem meus grandes amigos nesses 10 aninhos. Nem a distância foi capaz de mudar essa ligação que prezo infinitamente. Venham as próximas décadas.

À Letícia e a Débora, minhas amigas e companheiras de laboratório. Hoje passa em minha mente todos os momentos que passamos. Nem todos foram somente de alegrias, mas aprendemos a perdoar e pedir perdão, a apoiarmos umas às outras e assim cultivar nossa amizade.

Ao Patrick e Lino, meus amigos que estão sempre a me apoiar e incentivar apesar da distância.

À Márcia, pela amizade e apoio incondicional no laboratório, pelos cafés com suas pequenas, Clara e Luiza.

Ao Mário, que apesar da distância sempre me incentiva, ampara e conforta. Obrigada por suas orações meu amigo.

À Rosa, pelo seu carinho, apoio e conforto. Nesses dias sua presença e incentivo me trouxeram a esperança de continuar a realizar o que mais amo. Obrigada imensamente e poder contar com sua amizade é um privilégio.

Ao Paulo, meu eterno “filhinho” que adoro incondicionalmente. Agradeço por nossas conversas, incentivos e os descontraídos momentos de trabalho juntos.

Ao Lucas, pela incentivo, apoio e amizade. Obrigada por me auxiliar sempre.

Ao Vitor pela amizade e companheirismo. E desculpa fazer você ficar até tarde no laboratório me ajudando. Mas obrigado por se dispor a me auxiliar sempre que precisei.

Às “ meninas da Eloisa”, Andressa, Mariana, Pâmela, Priscila, Angélica, Fernanda e Mayara, por me ensinarem as técnicas do mundo do “Toxo e das células”. Obrigada pela convivência maravilhosa no período em que estive trabalhando com todas.

A professora Dra Bellisa de Freitas, pelo auxílio e disposição em me auxiliar nos procedimentos laboratoriais, pelos ótimos momentos de convivência.

À Rafaela, pelo auxílio, apoio, incentivo e, acima de tudo, a amizade, que foi importante para me fortalecer nos dias tempestivos.

Às minhas amigas e companheiras de evangelização, Kênia e Roseliane, pela imensa paciência, carinho e apoio. Nossos momentos juntos foram sempre de alegria e abençoado. Obrigada por aprender tanto com vocês e nossos pequenos.

Aos meus amigos mais que especiais que tive a oportunidade de conhecer em Belo Horizonte. Jaqueline obrigada pelo apoio, auxílio e conversas durante esse período. Daniel ou Muriel, pelos momentos descontraídos durante os almoços e lanches, até o noivado saiu. Ao Thiago pelo auxílio e incentivo, e por deixar eu bagunçar seu cabelo sempre (lógico que era fora da sala do espectrômetro, evitar contaminações). E não poderia deixar de agradecer ao meu querido Rodrigo. Obrigada por me receber e me auxiliar sempre que foi necessário, não tenho palavras para expressar o quanto se tornou importante em minha vida. Obrigada a todos, pelo carinho e momentos felizes que marcaram minha vida, mas ainda irão aprender a falar “bolacha”.

Aos meus companheiros queridos Mônica, David e Isabela, pelo apoio, incentivo, pelas trocas de conhecimentos e pelos momentos descontraídos.

Aos meus colegas do laboratório: Makswell, Denise, Fernanda, Daiana, Stéfani e Luana.

Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica: Tianinha, Marina, Janaina, Madson, Ismair e a Zu. Cada um me auxiliou em momentos ímpares. Mas no final tudo se ajeita e obrigada por poder contar com auxílio de vocês.

E a todos que aqui não consegui citar, vocês têm minha eterna gratidão.

Ao apoio financeiro da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES, UFU (Universidade Federal de Uberlândia) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar).

RESUMO

BpMP-I é uma metaloprotease não hemorrágica e fibrinogenolítica isolada da peçonha de *B. pauloensis*. No presente trabalho, foi investigada a reatividade cruzada de anticorpos policlonais anti-BpMP-I (IgG e IgY) isolados a partir do soro de camundongos (Balb-C) e da gema do ovo de galinhas (*White Leghorn*). Os anticorpos foram utilizados para detectar antígenos potenciais nas peçonhas para o enriquecimento do soro antiofídico. Posteriormente, os anticorpos anti-BpMP-I (IgG e IgY) foram acoplados à colunas de afinidade para o isolamento de proteínas alvo. As proteínas ligantes à anti-BpMP-I (IgG-Sepharose e IgY-Sepharose) foram submetidas às análises de eletroforese 2D e espectrometria de massa em MALDI TOF/ TOF. Os anticorpos anti BpMP-I também foram utilizados para identificar metaloproteases no secretoma de linhagem primária de câncer de mama (MACL-1). Inicialmente, os resultados de reatividade específica contra BpMPI confirmaram a eficácia da imunização e mostraram uma intensa reatividade cruzada entre as peçonhas de *B. pauloensis*, *B. jararaca*, *B. diporus* e *B. atrox*. Nenhuma reatividade cruzada foi detectada para a peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* e a fosfolipase A₂ (BnSP7), que foi utilizada como antígeno negativo. Os anticorpos foram eficientes em inibir as atividades azocaseinolítica e hemorrágica da BpMP-I e da peçonha de *B. pauloensis*, respectivamente, confirmando o seu potencial de neutralização. Aproximadamente, 20 (específico para IgY) e 23 (específico para IgG) *spots* foram detectadas em 2D SDS-PAGE, e somente 11 *spots* foram sequenciados, identificando principalmente metaloproteases da classe PIII e domínios lectina tipo-C. Além disso, os anticorpos anti-BpMP-I foram capazes de reconhecer proteínas na faixa de 72 kDa presentes no secretoma de linhagem primária de câncer de mama (MACL-1), provavelmente, a MMP-2, uma metaloprotease altamente expressa em uma variedade de células malignas, tais como câncer de mama. Analisados em conjunto, os nossos resultados mostraram que os anticorpos policlonais anti-BpMP-I foram capazes de reconhecer metaloproteases em diferentes peçonhas e no secretoma de células de câncer de mama, sugerindo a sua utilização como candidatos potenciais para inclusão no soro antiofídico ou tratamento e diagnóstico do câncer.

Palavras-chave: Metaloproteinase, metaloprotease, anticorpos, IgY, IgG, BpMP-I, antiofídico.

ABSTRACT

BpMP-I is a non-hemorrhagic metalloprotease isolated and fibrinogenolytic the venom of *B. pauloensis*. In the present work , we investigated the cross-reactivity of polyclonal anti-BPMP-I (IgG and IgY) isolated from the serum of mice (Balb-C) and chicken egg yolk (White Leghorn). The antibodies were used to detect potential antigens in venoms for enrichment of antivenom. Subsequently, the anti-BPMP-I antibodies (IgG and IgY) were coupled to affinity columns for isolation of target proteins. Proteins binding to the anti-BPMP-I (IgY and IgG-Sepharose Sepharose) were subjected to 2D electrophoresis analysis and mass spectrometry MALDI TOF / TOF. The BPMP-I antibodies were also used to identify metalloproteinases in secretome primary line of breast cancer (MACL-1). Initially, the results of specific reactivity against BpMPI confirmed the efficacy of immunization and showed a strong cross reactivity between the venom of *B. pauloensis*, *B. jararaca*, *B.* and *B. atrox diporus*. No cross reactivity was detected in the venom of *Crotalus durissus collilineatus* and phospholipase A2 (BnSP7), which was used as a negative antigen. The antibodies were effective in inhibiting the azocaseinolítica and hemorrhagic activities BPMP-I and the venom of *B. pauloensis* respectively, confirming its potential neutralization. Approximately, 20 (specific for IgY) and 23 (specific for IgG) were detected spots on 2D SDS-PAGE, and only 11 spots were sequenced by identifying mainly metalloproteases PIII class and type-C lectin domains. Furthermore, the anti-BPMP-I antibodies were capable of recognizing proteins in the range of 72 kDa present in secretome primary line of breast cancer (MACL-1), probably, MMP-2, a highly expressed metalloprotease in a variety of malignant cells such as breast cancer. Taken together, our results showed that anti-BPMP-I polyclonal antibodies were able to recognize metalloproteases in different venoms and secretome breast cancer cells, suggesting their use as potential candidates for inclusion in antiophidic or treating and diagnosis of cancer.

Keywords: Metalloproteinase, metalloprotease, antibodies, IgY, IgG, BpMP-I, antiophidic.

LISTA DE ABREVIATURAS

Gly – Glicina

His – Histidina

Glu – Glutamato

Asp – Aspartato

LAS-metalopeptidases – Lysostaphin-type enzymes, *D-Ala-D-Ala metallopeptidases and Sonic hedgehog*

PDB – *Protein Data Bank*

NTS – Subdomínio N- Terminal

CTS – Subdomínio C- Terminal

ADAMs – *A Disintegrin And Metalloproteinases*

ADAMTs – *A Disintegrin And Metalloproteinases with Thrombospondin motifs*

SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases*

RE – Retículo Endoplasmático

CTLPs – *C-Type Lectin Like Proteins*

IgG – Imunoglobulina G

IgY – Imunoglobulina Y

Fab – *Fragment antigen binding*

Fc – *Fragment crystallizable*

scFv – *single chain Fragment variable*

PLA₂ – Fosfolipase A₂

LAAO – L – aminoácido oxidase

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*

Bp – *Bothrops pauloensis*

Bj – *Bothrops jararaca*

Ba – *Bothrops alternatus*

Bd – *Bothros diporus*

Cdc – *Crotalus durissus colillineatus*

SDS – Dodecil- sulfato de sódio

AMBIC – Bicarbonato de amônio

PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis*

PBS – *Phosphate buffered saline*

DO – Densidade óptica
IE – Índice ELISA
DAB – Diaminobenzidino
i.d. – intradérmica
i.p. – intraperitoneal
2DE – Eletroforese bidimensional
IEF – Focalização Isoelétrica
DTT – Ditioneítrio
TCEP – Tris-2-carboxietil-fosfina
TFA – Ácido trifluoracético

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das metaloproteases .	22
Figura 2: Classificação das metaloendoproteases.	24
Figura 3: Modelo tridimensional das metaloendoproteases.	26
Figura 4: Topologia e estrutura dos domínios catalíticos das Metzincinas.	28
Figura 5: Modelo de zimogênio de metaloprotease.	29
Figura 6: Representação esquemática da família das ADAMALISINAS/Reprolisinas.	32
Figura 7: Estrutura das imunoglobulinas.	38
Figura 8 Representação da molécula de Imunoglobulina e seus fragmentos após clivagem com pepsina ou papaína	38
Figura 9: Análise venômica da peçonha de <i>B. pauloensis</i>	42
Figura 10: Alinhamento das sequências entre a BpMP-I e outras metaloproteases de peçonhas de serpentes.	45
Figura 11: Esquema geral para a obtenção do extrato concentrado de proteínas do ovo contendo as imunoglobulinas IgYs.	55
Figura 12: Etapas da purificação da metaloprotease BpMP-I.	69
Figura 13: Anticorpos IgG Anti-BpMP-I: Cinética da produção de anticorpos e Titulação do soro.	71
Figura 14: Anticorpos IgG anti-BpMP-I: Cromatografia de afinidade e Perfil eletroforético	72
Figura 15: Anticorpos IgY Anti-BpMP-I: Cinética da produção de anticorpos nas galinhas da raça White leghorn e Titulação do soro e das gemas.	74
Figura 16: Anticorpos IgY anti-BpMP-I: Cromatografia de afinidade e Perfil eletroforético	75
Figura 17: Reatividade cruzada das IgG anti-BpMP-I e das IgY anti-BpMP-I pelo método ELISA contra BpMP-I (metaloprotease), BnSP-7 (fosfolipase A2) e diferentes peçonhas brutas.	77
Figura 18: Perfil de reconhecimento de proteínas reduzidas de diferentes peçonhas por anticorpos policlonais IgG anti-BpMP-I e IgY anti-BpMP-I em western blotting	79

Figura 19: Perfil de reconhecimento de proteínas não reduzidas de diferentes peçonhas por anticorpos policlonais IgG anti-BpMP-I e IgY anti-BpMP-I em western blotting.....	80
Figura 20: Análise da intensidade de reação no Westen blotting das amostras reduzidas	81
Figura 21: Análise da intensidade de reação no Westen blotting das amostras não reduzidas	82
Figura 22: Determinação da atividade neutralizante dos anticorpos sobre a atividade proteolítica da BpMP-I em azocaseína.....	83
Figura 23: Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>B. pauloensis</i> por anticorpos anti-BpMP-I IgG e IgY	84
Figura 24 Atividade hemorrágica.....	84
Figura 25: Peçonha de <i>B. pauloensis</i> em colunas de afinidade	86
Figura 26: Triplicata dos géis bidimensionais da fração P2IgG.....	88
Figura 27: Triplicata dos géis bidimensionais da fração P2IgY	89
Figura 28 Géis bidimensionais das frações ligantes P2IgG e P2IgY, e os ‘spots’ identificados.....	90
Figura 29: Avaliação do perfil eletroforético das proteínas secretadas pelas células tumorais MACL-1 e a avaliação da atividade gelatinolítica.....	96
Figura 30 Perfil de reconhecimento de proteínas presentes no secretado de células tumorais MACL-1 por anticorpos policlonais IgG anti-BpMP-I e IgY anti-BpMP-I em western blotting.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Efeitos farmacológicos e terapêuticos de toxinas isoladas de <i>B. pauloensis</i>	43
Tabela 2 Toxinas derivadas de peçonhas botrópicas que apresentam identidade estrutural com a BpMP-I	78
Tabela 3: Rendimento proteico das cromatografias de afinidade da peçonha <i>B. pauloensis</i>	85
Tabela 4 Identificação dos spots das frações ligadas a IgG-Sepharose e IgY-Sepharose.	91
Tabela 5 Proteínas identificadas comumente encontradas nas amostras ligantes da IgG sepharose e da IgY Sepharose.....	95

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	20
1.1 Metaloproteases.....	21
1.1.1 Classificação.....	22
1.1.2 Metzincinas.....	25
1.1.2.1 Ativação e mecanismo de catálise das Metaloproteases Metzincinas.....	29
1.1.2.2 Adamalinas/ Reprolisinas	30
1.1.2.3 SVMPs – Snake Venom MetalloProteinases – Metaloproteases de peçonhas de Serpentes.....	32
1.2 Acidentes ofídicos e soroterapia	34
1.3 Proteômica e antivenômica	40
1.4 BpMP-I – Metaloprotease da classe P-I.....	44
II. OBJETIVOS	46
2.1. Objetivo geral	47
2.2. Objetivos específicos:	47
III. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Obtenção das peçonhas e animais	50
3.2 Reagentes.....	50
3.3 Isolamento da Metaloprotease BpMP-I	50
3.4 Dosagem de proteínas	51
3.5 Eletroforese Unidimensional	51
3.6 Produção de anticorpos policlonais anti-BpMP-I.....	52
3.6.1 Imunizações dos camundongos da linhagem isogênica Balb-c.....	52
3.6.2 Imunizações das galinhas da raça <i>White Leghorn</i>	53
3.7 Preparação do soro e purificação das IgGs	53
3.8 Preparo do extrato proteico da gema e isolamento das IgYs.....	54
3.9 Ensaio de imunorreatividade por ELISA.....	56
3.10 <i>Western Blotting</i>	57
3.11 Validação do potencial neutralizador dos anticorpos policlonais anti-BpMP-I.....	58
3.11.1 Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>B. pauloensis</i>	58

3.11.2	Inibição da atividade azocaseinolítica da metaloprotease BpMP-I ...	58
3.12	Imobilização de anticorpos (IgG/ IgY anti-BpMP-I) em matriz CNBr-Sepharose.....	59
3.13	Purificação de proteínas ligantes aos anticorpos IgG e IgY anti-BpMP-I da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>	59
3.13.1	Preparo da amostra	59
3.13.2	Cromatografia de afinidade	60
3.14	Eletroforese Bidimensional (2DE)	60
3.14.1	Preparo das amostras	60
3.14.2	Primeira dimensão – focalização isoeétrica.....	60
3.14.3	Preparo das fitas focalizadas – Redução e Alquilação	61
3.14.4	Segunda dimensão – Gel de poliacrilamida	61
3.15	Processamento e análise das imagens.....	62
3.16	Remoção da coloração dos spots: Redução e Alquilação	62
3.17	Digestão e extração das proteínas em gel	63
3.18	Análise por espectrometria de massa	64
3.19	Análise das sequências em banco de dados	64
3.20	Linhagens celulares e manutenção das culturas	64
3.21	Extração do secretoma das células MACL-1	65
3.22	Atividade Gelatinolítica.....	65
3.23	Imunolocalização de alvos no secretoma de células tumorais.....	66
3.24	Análise estatística	66
IV.	RESULTADOS	67
4.1	Isolamento da metaloprotease BpMP-I	68
4.2	Produção e purificação de anticorpos policlonais anti-BpMP-I.....	69
4.2.1	Titulação e isolamento dos anticorpos IgG anti-BpMP-I	69
4.2.2	Titulação e isolamento dos anticorpos IgY	73
4.3	Ensaio de reatividade cruzada dos anticorpos anti-BpMP-I pelo método ELISA.....	76
4.4	Análise de reconhecimento dos anticorpos para diferentes peçonhas por western blotting.....	78
4.5	Validação do potencial neutralizador dos anticorpos policlonais (IgG E IgY) anti-BpMP-I.....	83

4.5.1 Neutralização da atividade azocaseinolítica da BpMP-I.....	83
4.5.2 Neutralização da atividade hemorrágica da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>	83
4.6 Cromatografias da peçonha <i>B. pauloensis</i> em colunas de afinidade	84
4.7 Análise em géis bidimensionais das frações ligadas dos anticorpos policlonais anti-BpMP-I	87
4.8 Identificação das proteínas	87
4.9 Imunolocalização de alvos no secretoma de células tumorais.....	96
V. DISCUSSÃO.....	98
VI. CONCLUSÃO.....	110
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

I. INTRODUÇÃO

1.1 METALOPROTEASES

As metaloproteinases ou metaloproteases, classe de enzimas hidrolíticas comumente dependentes de íons metálicos, estão amplamente distribuídas em seres procariotos e eucariotos (**fig.1**). Tais enzimas são responsáveis por clivar ligações peptídicas de suma importância para a manutenção da vida, participando de diferentes eventos fisiológicos, tais como digestão, remodelagem, manutenção e desenvolvimento tecidual. Além disso, estão envolvidas em processos proteolíticos de alta especificidade que podem ativar ou inativar outras enzimas, peptídeos bioativos ou repressores de DNA. Dessa forma, atuam em importantes mecanismos regulatórios, como controle da pressão sanguínea, homeostase hormonal, regulação das vias de transdução de sinais e modulação da interação célula-célula através das proteínas de superfície (BECK,1973; NEURATH,1975; NEURATH; WALSH 1976; GOMIS-RÜTH,2003; GOMIS-RÜTH,2009; GOMIS-RÜTH; BOTELHO; BODE, 2012; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH,2014). Desordens relacionadas à sua regulação podem levar a uma diversidade de patologias, como inflamação, lesões teciduais, doenças neurodegenerativas e algumas alterações cardiovasculares (DOLLERY; LIBBY, 2006; NALIVAEVA et al., 2008; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH,2014). As metaloproteases são capazes de diminuir as defesas do organismo e causar sérios danos teciduais, que são observados durante as infecções microbianas e nos efeitos causados pós- acidentes ofídicos, como a hemorragia e necrose tecidual (TAKEYA; IWANAGA, 1998; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012). Por serem imprescindíveis em diversos processos fisiopatológicos, as metaloproteases se tornaram promissores alvos para elaboração de novos agentes terapêuticos, como as matrixinas que estão relacionadas a invasão e progressão do câncer (LÓPEZ-OTÍN; OVERALL, 1992; GOMIS-RÜTH, 2003; HOET et al., 2005; DEVY et al., 2009; GOMIS-RÜTH,2009; KAIMAL et al.,2013; ROOSMARIJN; VANDENBROUKE; LIBERT, 2014).

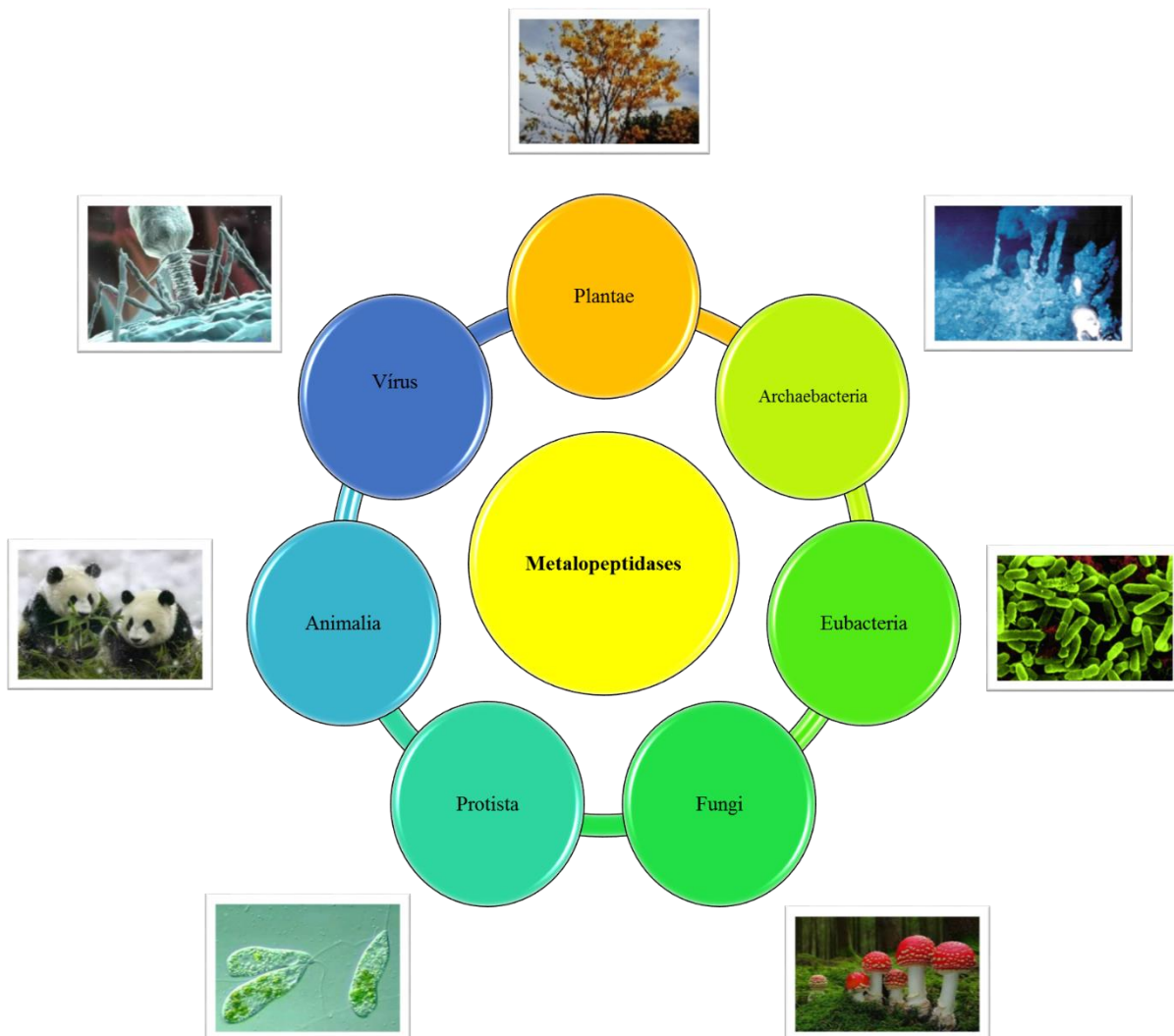


Figura 1: Distribuição das metaloproteases em diferentes reinos.

1.1.1 Classificação

As metaloproteases constituem uma família de enzimas do grupo de proteases, classificadas em metaloexopeptidases (EC: 3.4.17) ou metaloendopeptidases (EC: 3.4.24). Uma das metodologias classificatórias amplamente aceita para a classificação de proteases é a apresentada pelo MEROPS *database*, nesta abordagem classificatória, as proteases são agrupadas em espécies, famílias e clans, baseadas em suas similaridades sequenciais e em suas distâncias evolutivas (RAWLINGS et al., 2014). Outra forma concebível de classificação baseia-se no arquétipo do sítio ativo e da similaridade da sua estrutura tridimensional. De acordo com essa

classificação, as metalopeptidases são divididas em dois grupos, o primeiro apresenta apenas um metal no sítio catalítico (mononuclear) e o segundo têm dois metais (binuclear) (**fig.2**). As metalopeptidases binucleares são formadas principalmente de exopeptidases. As metaloendopeptidases estão amplamente concentradas nas subclasses de metalopeptidases mononucleares (CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014; ZHANG et al., 2015).

As metalopeptidases monucleares apresentam em seu sítio catalítico apenas um íon metálico divalente, geralmente zinco, mas em algumas vezes podem estar presentes os íons cobalto, manganês ou níquel. Esses metais ficam ancorados em determinados aminoácidos, usualmente a His, Glu, Asp, e são esses motivos ligantes que caracterizam as subdivisões: tribos, clans e famílias (GOMIS-RÜTH; BOTELHO; BODE, 2012).

A sequência ligante de zinco, **HEXXH**, descrita em 1987, inclui 2 histidinas ligantes do metal e um ácido glutâmico necessários para a catálise, e estão presentes nas enzimas da tribo Zincinas (MCKERROW, 1987). Nesse mesmo nível hierárquico temos as Inverzincinas (**HXXEH**), que apresentam a sequência ligante de zinco invertida (BECKER; ROTH, 1993; HOOPER, 1994); as $\alpha\beta$ - exopeptidases que compreendem apenas o clan das Funnelinas (GOMIS-RÜTH, 2008; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014); as LAS metalopeptidases (do inglês *Lysostaphin-type enzymes, D-Ala-D-Ala metallopeptidases and Sonic hedgehog*) (BOCHTLER et al., 2004; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014); e as semelhantes aos fatores de maturação de hidrogenase, HybD, metalopeptidase níquel-dependente (FRITSCHÉ et al., 1999; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014) (**fig.2**). As Zincinas, por sua vez, estão divididas nos seguintes clans: Metzincinas; Gluzincinas; S2P-zincinas; Aspzincinas; Enzimas semelhantes à FtsH (**fig.2**).

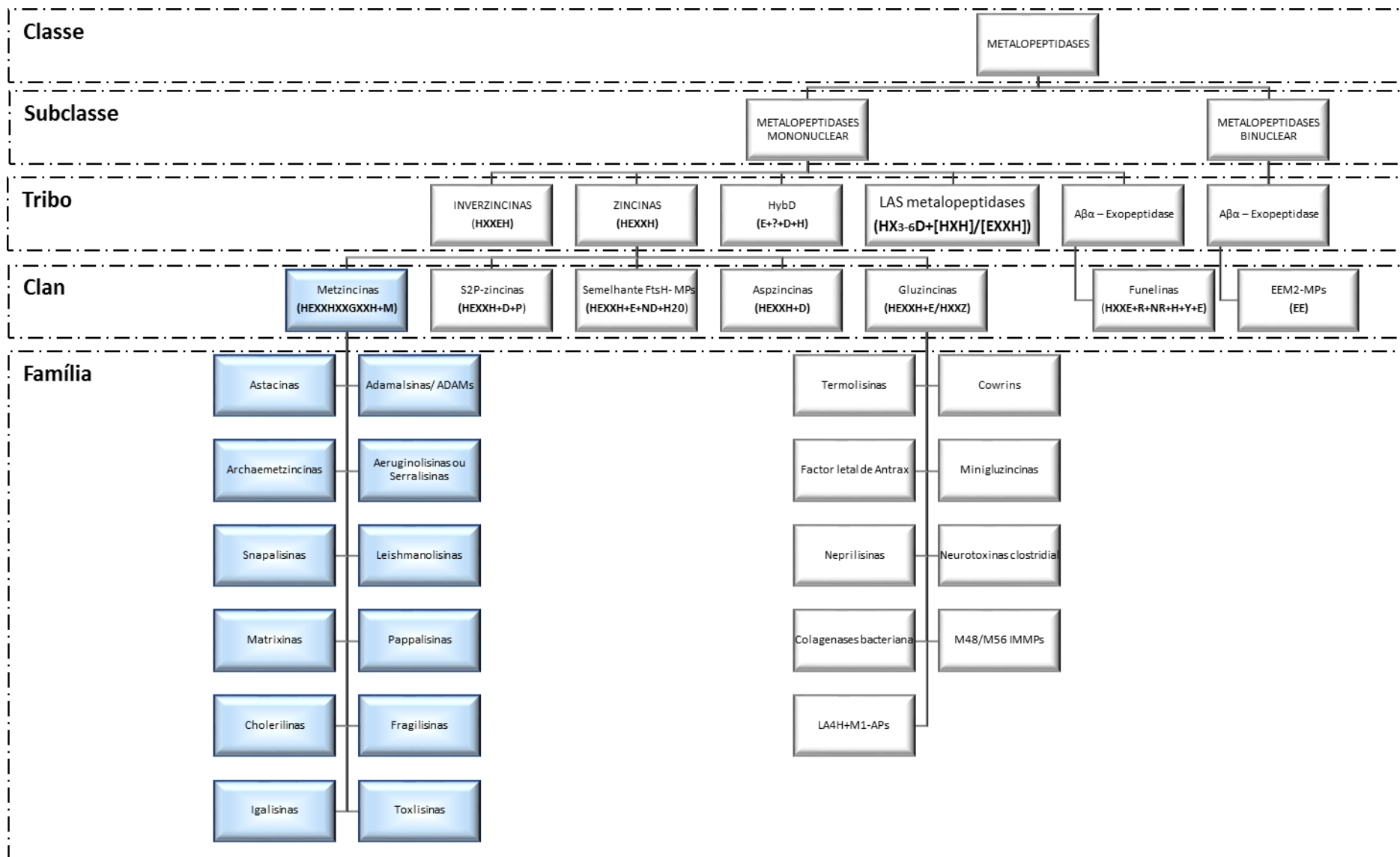


Figura 2: Classificação das metaloendoproteases. Fonte: Adaptado de Cerdà-Costa e Gomis-Rüth (2014).

1.1.2 METZINCINAS

O clan das Metzincinas compreende as hidrolases que apresentam em seu domínio catalítico a sequência consenso: **HEXXHXXGXX(H/D)**, contendo os três resíduos de His ligantes do zinco, e além disso, todas as estruturas têm uma metionina conservada, comumente designada como “*Met-turn*”, logo após o centro ligante do zinco, que forma uma fenda hidrofóbica para a ancoragem do íon metálico (BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKER, 1993; GOMIS-RÜTH, 2003).

As Metzincinas estão presentes em todos os reinos e mais de 300 estruturas já foram caracterizadas e suas sequências contendo o domínio catalítico depositadas em banco de dados, como o PDB (*Protein Data Bank*). Esse clan de proteases até o presente momento está dividido em doze famílias estruturalmente caracterizadas: Astacinas, Aeruginolisinas ou Serralisinas, Leishmanolisinas, Snaplisinas, Matrixinas, Adamalisinas/ADAMs, Archaemetzincinas, Pappalisinas, Fragilisininas, Toxilisinas, Cholerilisininas, Igalisininas (**fig.2**). Essas famílias apresentam um domínio catalítico formado por uma estrutura de 130 a 270 resíduos de aminoácidos aproximadamente, contendo em seu domínio catalítico a mesma sequência consenso presentes nas Zincinas, no entanto possuem alguns elementos estruturais distintos, como a presença adicional de estruturas secundárias (**fig.4**) (BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKER, 1993; HOOPER, 1994; GOMIS-RÜTH, 2003; GOMIS-RÜTH, 2009; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014).

O domínio catalítico dessas metaloproteases é dividido horizontalmente por uma fenda catalítica em dois subdomínios, N- terminal (NTS – subdomínio superior) e C- terminal (CTS – subdomínio inferior) (**fig.3 e 4**) (GOMIS-RUTH; BOTELHO; BODE, 2012). A sequência consenso do subdomínio N- Terminal é constituída por 5 folhas β (β I a β V) na porção superior, sendo elas paralelas, com exceção da fita antiparalela, β IV, (**fig.4**), a qual se liga ao substrato de forma antiparalela (MASKOS; BODE, 2003; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014). O *loop* que conecta as folhas β III e β IV gera uma protuberância nos elementos estruturais, que afeta principalmente os subsítios de ligação do substrato S_1' e S_2' (**fig.3**). Esse é o motivo pelo qual existe uma extensiva variação na interação enzima-substrato na fenda catalítica. O NTS contém duas alfas-hélices em sua

estrutura, a primeira αA fornece suporte a estrutura, enquanto que a segunda αB integra o sítio catalítico. A alfa-hélice αB é arranjada no côncavo do sítio, semelhante em todas as estruturas dos domínios catalíticos das Metzincinas. Além disso, a alfa-hélice αB engloba a primeira metade do motivo de ligação ao zinco, que inclui os dois primeiros resíduos de histidina (CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014).

O subdomínio C- Terminal começa logo após a Gly consenso presente no final da alfa-hélice αB , e leva em sua estrutura o terceiro ligante de zinco, uma histidina ou um aspartato, formando assim o motivo ligante de zinco das metzincinas. O resíduo imediatamente “*downstream*” ao ligante é denominado “resíduo específico da família” e é característico em cada família. Os CTS apresentam apenas alguns elementos estruturais secundários, no final da cadeia se tem uma alfa- hélice (αC). Essa por sua vez, se conecta a alfa hélice αB por estruturas que variam em comprimento e conformação. Porém, existe uma estrutura que se manteve conservada nessa família, 1,4 β -“turn” contendo uma metionina na posição 3, “Met-turn”. Essa metionina está separada do terceiro ligante de zinco por um segmento conectivo que varia de 6 a 77 resíduos de aminoácidos (CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014).

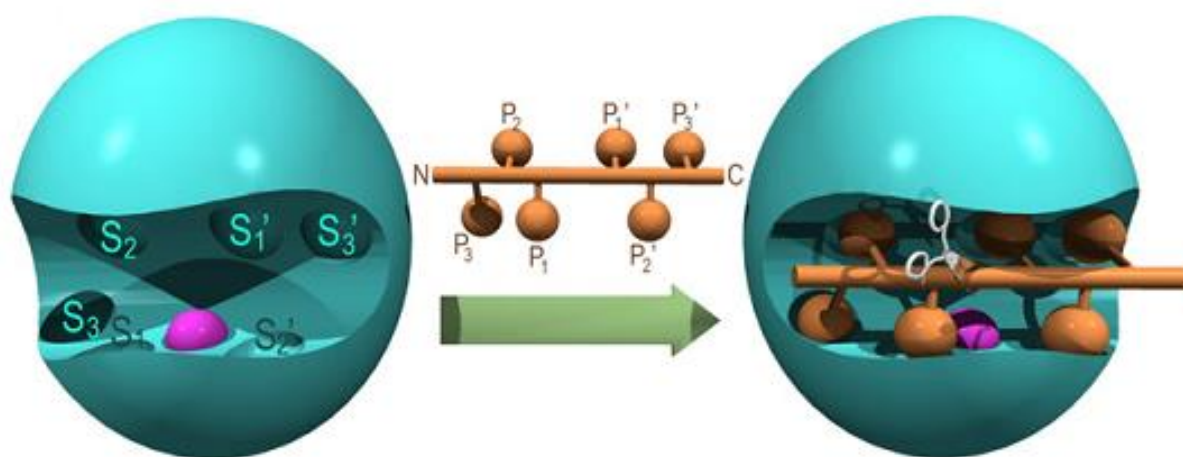
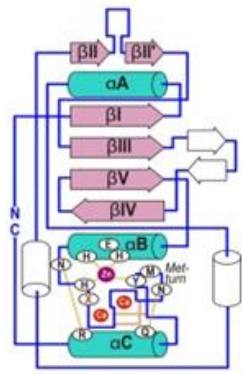
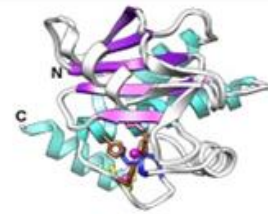
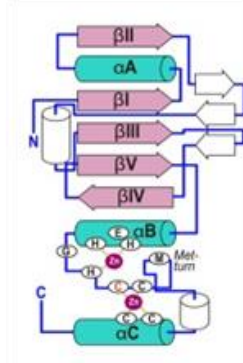


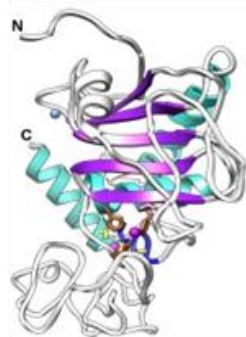
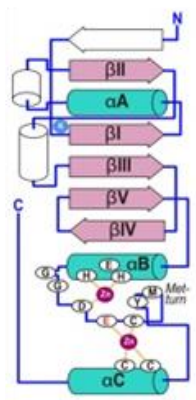
Figura 3: Modelo tridimensional das metaloendoproteases, mostrando a fenda catalítica com o íon metálico (rosa) e o locais de posicionamento do substrato (S1 a S3; S1' a S3'). No centro, temos o modelo de um substrato péptico em conformação estendida que descreve as cadeias laterais (P1 a P3; P1' a P3') em ambos os lados da ligação físsil (marcada com a tesoura) (GOMIS-RÜTH; BOTELHO; BODE, 2012).



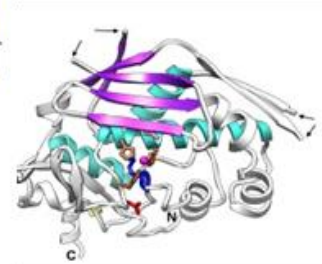
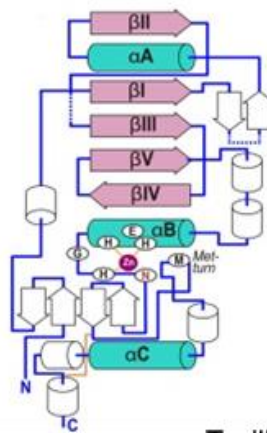
Pappalysin



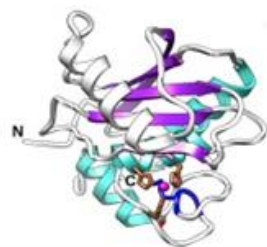
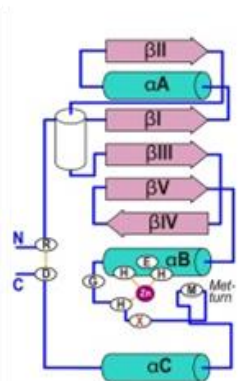
Archazem zincin



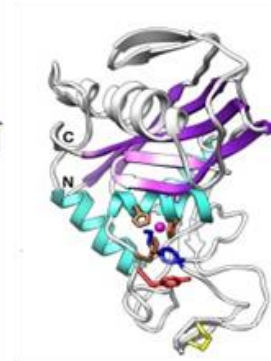
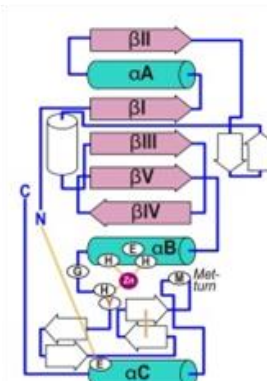
Igalysin



Toxilis



Fragilis



Choleric

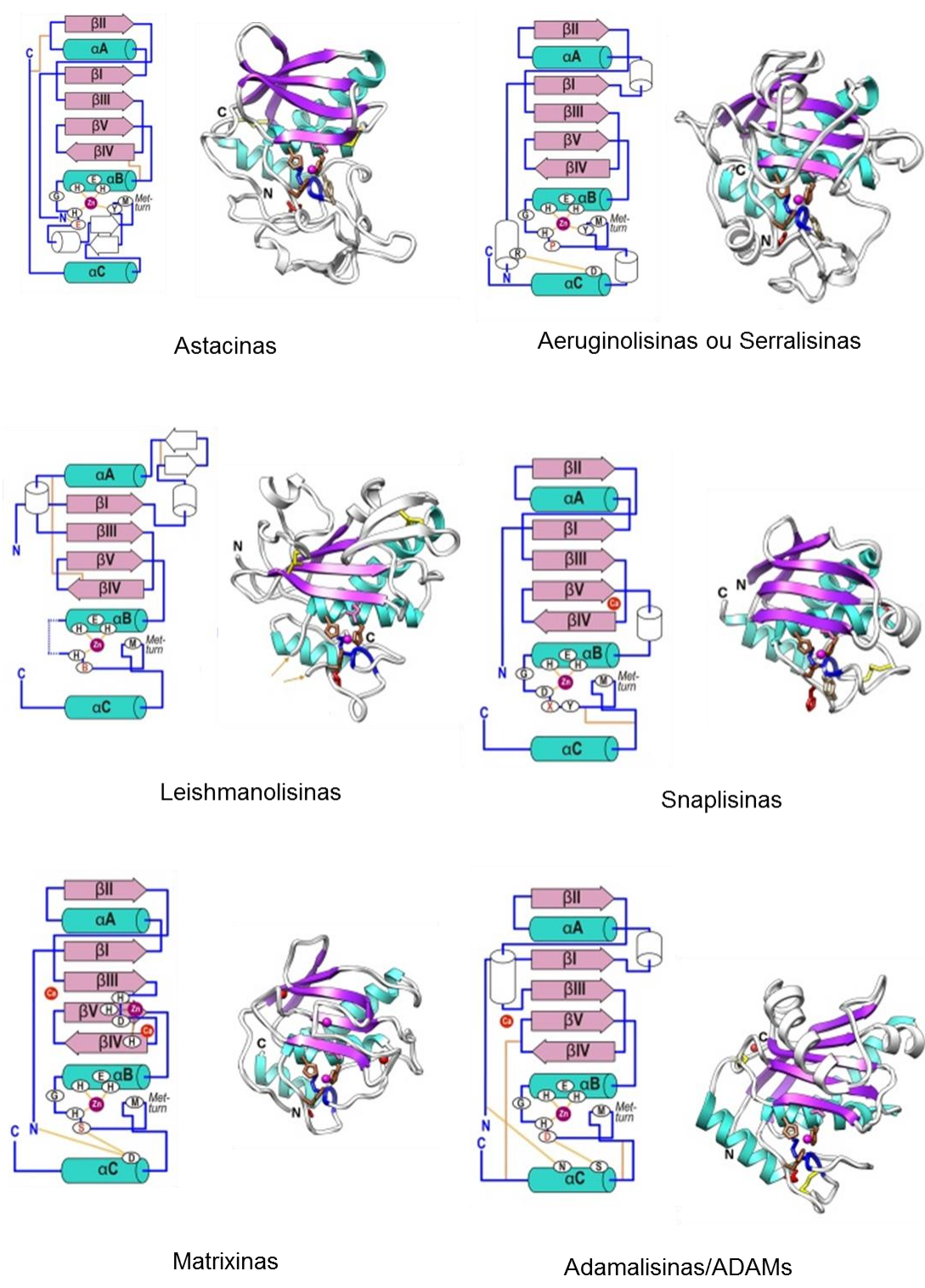


Figura 4: Topologia e estrutura dos domínios catalíticos das Metzincinas. O esquema mostra os elementos estruturais regulares (α -hélices em forma cilíndrica; folhas β em formas de setas) de cada protótipo do clã Metzincina. Os elementos comuns estão marcados em rosa (folhas β) e turquesa (α -hélices) e identificados (β I a β V; α A a α C). Resíduos de aminoácidos pertencentes ao motivo ligante de zinco em destaque, assim como o resíduo específico para cada família (vermelho), resíduos hidrofóbicos e X para quaisquer resíduos. Fonte: Adaptado de Cerdà-Costa e Gomis-Rüth (2014).

1.1.2.1 ATIVAÇÃO E MECANISMO DE CATÁLISE DAS METALOPROTEASES METZINCINAS

As metaloproteases são secretadas como zimogênios e são ativadas geralmente por hidrólise de um pró-domínio através de um mecanismo cisteína switch. Neste mecanismo, o grupo tiol de um resíduo de cisteína presente numa sequência altamente conservada (PKMCGVT), adjacente ao domínio protease, está coordenado ao íon zinco do sítio ativo, dessa forma bloqueando a função enzimática (**fig.5**). O complexo simultaneamente bloqueia o sítio ativo e provavelmente exclui a água da esfera de coordenação do átomo de zinco. Todas as zinco-hidrolases ativas possuem uma molécula de água como um quarto ligante que é essencial para a catálise.

A interrupção da interação cisteína-zinco (**fig.5**) causa ativação da molécula, que é iniciada por proteases que clivam sítios específicos dentro do pro-peptídeo, mas a ativação final das metaloproteases para a forma madura

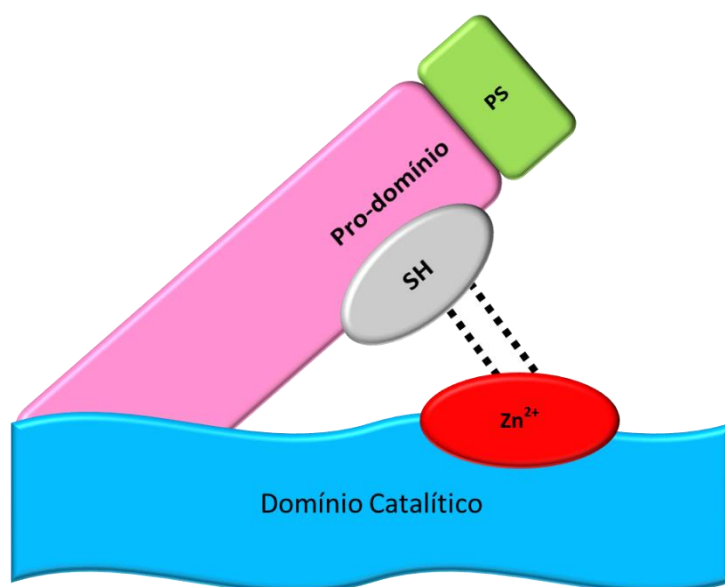


Figura 5: Modelo de zimogênio de metaloprotease. Fonte: Adaptado de Tocchi e Parks (2013)

requer a retirada do pro-peptídeo inteiro por um mecanismo de autólise (MATRISIAN, 1992; GRAMS et al., 1993). Estas metaloproteases também podem 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).

Estudos estruturais das metaloproteases, como a termolisina, elucidam como o Zn^{++} se organiza em todas as etapas da catálise. Inicialmente, ele fica coordenado tetraedricamente pela His142, His146, His152 e pela molécula de água. A presença da molécula de água localizada entre o grupo carboxílico do Glu143 catalítico (posição das termolisinas, porém a mesma pode alterar em outras famílias) e o íon zinco provoca um aumento da polarização na região, isto possibilita a transferência de um próton da molécula de água para o Glu, 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 pentacoordenado. 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, 1995; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; CORONADO et al., 2014).

1.1.2.2 ADAMALISINAS/ REPROLISINAS

A família nomeada Adamalinas, ADAMS ou reprotinas, constitui-se de objeto de amplo estudo, está subdividida em três grupos: ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*), ADAMTs (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*) e Metaloproteases de Peçonhas de Serpentes (SVMPs *Snake Venom Metalloproteinases*) (BJARNASON; FOX, 1995; WOLFSBERG et al., 1995; GOMIS-RÜTH, 2003; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014)

As ADAMs, inicialmente descobertas no trato reprodutivo dos mamíferos, estão relacionadas com a fertilização e função dos espermatozoides (TAKEYA; IWANAGA, 1998; KAWAGUCHI et al., 2002; PRIMAKOFF; MYLES, 2002). Elas também estão envolvidas na miogênese, desenvolvimento e neurogênese, diferenciação de células osteoblásticas e na modulação da migração celular. Além disso, estão relacionadas com desordens fisiológicas, como processos inflamatórios, asma, artrite reumatoide, e doença de Alzheimer. As ADAMTs são responsáveis por desestabilizar a adesão celular ligando-se às integrinas. Essas

proteases estão também envolvidas na formação das gônadas, desenvolvimento embrionário e angiogênese, ativação do procolágeno, e, além disso, participam dos processos inflamatórios, degradação da cartilagem nas artrites e na invasão tumoral (BLOBEL, 1997; SLACK; MA; SEAH, 2001; CAL et al., 2002; GOMIS-RÜTH, 2003; MOCHIZUKI; OKADA, 2007; MURPHY; NAGASE, 2008; APTE, 2009; TAKEDA; TAKEYA; IWAGANA, 2012; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH,2014)

Por fim, as SVMPs são enzimas presentes nas peçonhas de serpentes que induzem alterações no sistema hemostático, além de gerarem hemorragias locais e sistêmicas. Essas proteases são também responsáveis por efeitos que caracterizam a lesão tecidual após o acidente ofídico, como edema, hemorragia, necrose e inflamação (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MATSUI et al., 2000; LAING et al., 2003; GUTIÉRREZ et al., 2005).

As adamalisinases/ reprotisinases são proteínas modulares (**fig.6**) possuindo um pro-domínio e domínios metaloprotease dependente de zinco e/ou cálcio, desintegrina ou semelhante à desintegrina, rico em cisteína, semelhante ao fator de crescimento epidermal, semelhante à trombospondina do tipo 1, e/ou domínios transmembrânicos, bem como os citoplasmáticos (SPRINGMAN et al., 1990; GRAMS et al., 1993; GOMIS-RÜTH, 2003; GOMIS-RÜTH, 2009; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH,2014).

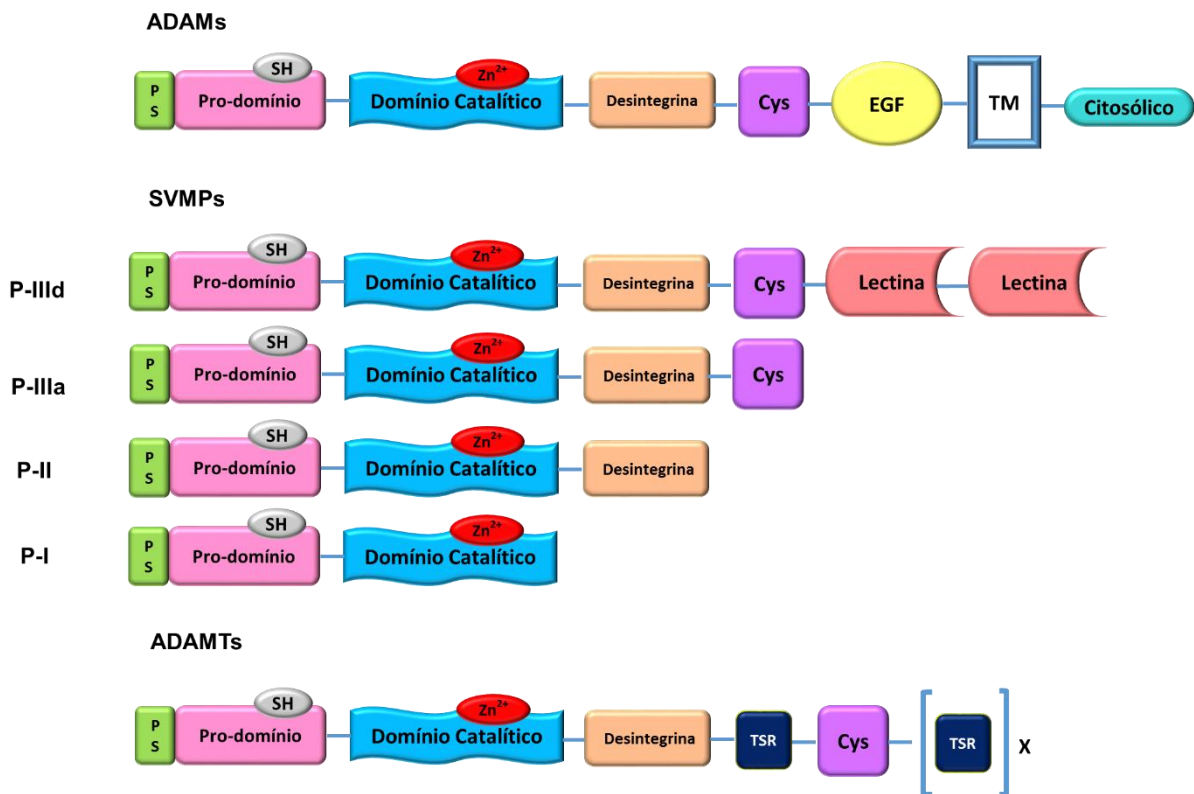


Figura 6: Representação esquemática da família das ADAMALISINAS/Reprolisinas. Cada domínio ou segmento é representado por uma cor diferente. PS: peptídeo sinal; Cys: domínio rico em cisteína; EGF: domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal; TM: região transmembrana; TSR: repetido motivo semelhante a trombospondina. Adaptado de Edwards e colaboradores (2008)

1.1.2.3 SVMPs – Snake Venom MetalloProteinases – Metaloproteases de peçonhas de Serpentes

As SVMPs são sintetizadas na forma de zimogênios contendo diversos domínios e esses desempenham funções que as auxiliam no direcionamento, inativação e toxicidade (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; FOX; SERRANO, 2008). As SVMPs podem apresentar os seguintes domínios:

- **Peptídeo sinal (P)** é constituído por uma sequência de 18 resíduos de aminoácidos, em sua maioria hidrofóbicos, e que provavelmente direciona a proteína sintetizada no retículo endoplasmático (RE) (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; FOX; SERRANO 2008).
- **Pró-domínio** é composto por 200 resíduos de aminoácidos que são extremamente conservados nos integrantes das SVMPs. Essa

região contém a sequência PKMCGVT, que proporciona a inativação da enzima pelo mecanismo “*cysteine-switch*” modulando a atividade enzimática desse grupo (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

- ***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 um resíduo de metionina 166 (*met-turn*) que provavelmente seja responsável por manter a estabilidade da estrutura para favorecer a ligação do zinco (FOX; SERRANO, 2005; RAMOS; SELISTRE, 2006)
- ***Interdomínio*** – segmento com 13-15 resíduos de aminoácidos que se encontra entre os domínios metaloproteinase e desintegrina/semelhante à desintegrina. (FOX; SERRANO, 2005; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).
- ***Desintegrina e semelhante a desintegrina*** – podem variar de 41 a 100 resíduos de aminoácidos e contém pontes de dissulfeto em sua estrutura. As desintegrinas encontradas nas peçonhas de serpentes podem apresentar diferentes motivos que interagem com diferentes tipos de integrinas. (KINI; EVANS, 1992; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).
- ***Rico em Cisteína*** – formando por 112 resíduos de aminoácidos, nas SVMPs está localizada na porção C-terminal do domínio desintegrina.
- ***Semelhante a lectina tipo-C*** (CTLPs) – 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*).

As metaloproteases de peçonha de serpentes sofrem processamento proteolítico resultando em uma variedade de proteínas multifuncionais classificadas de acordo com a organização de seus domínios estruturais, a saber: (**fig.6**): classe P-I (possuem apenas o domínio metaloprotease); PIIa a

PIIe (possuem os domínios metaloprotease e desintegrina; podem estar presentes como dímeros ou somente como dímeros de desintegrina). PIIIa a PIIIc (contêm o domínio metaloprotease, desintegrina-*like* e domínio rico em cisteínas, podem também formar dímeros) e finalmente PIIId, anteriormente conhecida como PIV (contêm os mesmos domínios estruturais das PIII e 2 domínios lectina tipo-C conectados por ligações dissulfeto) (FOX;SERRANO, 2008).

As SVMPs são as principais proteases encontradas nas peçonhas da família Viperidae (CALVETE; MARCINKIEWICZ; SANZ, 2007; FOX; SERRANO 2008; RODRIGUES et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015). Essas enzimas são responsáveis pelas alterações no sistema hemostático e por causar hemorragias locais e sistêmicas. Atuam na degradação dos componentes da membrana basal vascular, que contribui para o extravasamento sanguíneo. (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MATSUI et al., 2000; LAING et al., 2003; GUTIÉRREZ et al., 2005; GUTIERREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009; ESCALANTE et al., 2011; RODRIGUES et al., 2015).

Em geral, a ação *in vitro* das SVMPs está relacionada à proteólise dos componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina), proteínas do plasma (fibrinogênio, fibrina, fator de Von Willenbrand, protrombina) e proteínas da superfície celular (integrinas e caderinas). Além disso, SVMPs são capazes de interagir com receptores das plaquetas, de células endoteliais e fibroblastos, ativando ou inibindo a resposta celular (WHITE, 2005; MOURA-DASILVA et al., 2007). Esses efeitos podem resultar em várias alterações fisiopatológicas tais como inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e principalmente hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 2005), uma das principais complicações do envenenamento ofídico.

1.2 ACIDENTES OFÍDICOS E A SOROTERAPIA

As serpentes pertencem a ordem Squamata e estão distribuídas em três superfamílias: Scolecophidia (Typhlopoidea), Henophidia (Boidea) e Caenophidia (Xenophidia) (GRAHAM et al., 2007). As serpentes mais desenvolvidas e especializadas são representadas pela superfamília Caenophidia, as quais incluem dentre outras, as famílias Colubridae, Elapidae e

Viperidae (GRAHAM et al., 2007). No Brasil, a família Viperidae é a principal responsável pelos acidentes ofídicos, compreendendo importantes gêneros como *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*. As espécies pertencentes a esses gêneros possuem peçonhas ricas em diversas proteínas e peptídeos, com uma diversidade de ações bioquímicas e farmacológicas tornando-as alvos de inúmeros trabalhos que visam compreender novos mecanismos de ações e aplicações terapêuticas.

As peçonhas de serpentes são complexas misturas de proteínas e polipeptídeos farmacologicamente ativos produzidos e estocados em uma glândula altamente especializada (SILVA et al., 2001; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). Os constituintes proteicos compreendem toxinas com ação enzimática (metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidase, fosfodiesterases, colinesterases, hialuronidases, ATPases, NAD nucleosidases, catalases, aminotransferases e β-glucosaminidases) e não enzimática (cardiotoxinas, citotoxinas, fatores de crescimento vascular e neural, lectinas tipo-C, inibidores e peptídeos desintegrinas (TU, 1996; JANG et al., 2009).

O conhecimento da composição proteica e do mecanismo de ação dessas peçonhas tem uma importância significativa para o tratamento dos acidentes ofídicos, os quais são caracterizados por uma multiplicidade de ações sistêmicas e locais incluindo principalmente: distúrbios da hemostasia, hemorragia, edema e necrose tecidual. A neutralização desses efeitos se baseia na soroterapia usual que consiste na administração parental de soros antiofídicos o qual são uma mistura de imunoglobulinas ou anticorpos resultantes da sensibilização de animais (geralmente cavalos) por aplicações sucessivas de doses da peçonha bruta (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

O soro antiofídico é obtido do plasma de cavalos imunizados contra a peçonha por um processo lento que envolve várias etapas incluindo o preparo das amostras, a inoculação das mesmas nos animais por um esquema de nove injeções subcutâneas de 5mg da peçonha em 10mL de solução salina (NaCl 0,9%) a cada 7 dias. Na primeira inoculação é utilizado o adjuvante de Freund's completo, a segunda com adjuvante de Freund's incompleto e as outras sete podem ser realizadas com hidróxido de alumínio 2% ou com solução salina

(VILLAR et al., 2005). O plasma dos animais inoculados é utilizado para a obtenção do soro enriquecido em imunoglobulinas G, por meio de precipitações com sulfato de amônia. Este soro deve ser administrado preferencialmente diluído em solução glicosada na razão de 1:10 (v/v) em infusão endovenosa (CARDOSO et al, 2003). As doses de soro inoculadas nas vítimas são baseadas na estimativa da quantidade de peçonha que a serpente pode inocular durante a picada. A estimativa é feita com base na quantidade de peçonha obtida em uma extração. Para as serpentes *B. jararaca*, por exemplo, em média a quantidade que se obtêm de uma extração é de 160mg da peçonha, que se inoculada em uma vítima levaria a um caso de envenenamento considerado como moderado e o tratamento é realizado utilizando-se de 4 a 8 ampolas de soro antiofídico (JORGE; RIBEIRO, 1997).

Os soros antiofídicos são constituídos por imunoglobulinas G de mamíferos que são formadas por duas cadeias leves idênticas com aproximadamente 25kDa e duas cadeias pesadas idênticas de 55 a 77kDa. E em cada cadeia são encontradas duas regiões distintas: uma sequência variável na região N-terminal e uma sequência constante na região C-terminal. As cadeias leves apresentam regiões constantes e variáveis compostas por aproximadamente 110 resíduos de aminoácidos cada. E as cadeias pesadas apresentam as regiões variáveis com 110 resíduos de aminoácidos enquanto que as regiões constantes podem variar esse número entre 330 a 440 aminoácidos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; ALBERTS et al., 2010).

As regiões variáveis de ambas as cadeias, leves e pesadas, se encontram para formar o sitio de ligação ao antígeno, e a variabilidade nessa sequência de aminoácidos confere a diversidade de sítios de ligações aos antígenos. Uma faixa de 5 a 10 aminoácidos de cada região hipervariável forma o sítio de ligação do antígeno, como resultado, o tamanho do determinante antigênico que um anticorpo reconhece é relativamente pequeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; ALBERTS et al., 2010). As interações entre essas cadeias ocorre por interações covalentes (pontes dissulfetos) ou não covalentes que auxiliam na formação de domínios das imunoglobulinas, que constituem as diferentes regiões dos anticorpos, Fab (do inglês, *Fragment antigen binding* – fragmentos de ligação ao antígeno) e Fc (*Fragment, Crystallizable* – Fragmento cristalizável)

ambas ligadas por uma região flexível (região de dobradiça) (**fig.7**) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Em aves, reptéis, anfíbios e peixes pulmonados a principal classe de anticorpos é representada pela imunoglobulina Y (IgY), que desempenha papel semelhante a IgG de mamíferos (WARR et al., 1995; CARLANDER et al., 1999; MUNHOZ et al., 2014). A estrutura da IgY apresenta diferença significativa quando comparada com a IgG de mamíferos. Assim como a IgG de mamíferos a IgY contém as duas cadeias pesadas e as duas leves que somam 180 kDa, onde as cadeias pesadas e as leves chegam a ter aproximadamente 68 kDa e 18,6 kDa, respectivamente. A região Fab, semelhante a de IgG de mamíferos, contém os sítios de ligação para os antígenos. As cadeias pesadas da IgY são também chamadas de cadeias epsilon (ν) e geralmente formadas por um domínio variável (V) e 4 domínios constantes (C – C1 a C4), enquanto que as cadeias pesadas da IgG têm 4 domínios (V; C1 a C3) (**fig.7**). Outra diferença entre as IgG e IgY é a presença de um região de ligação entre os domínios C1 e C2 das IgG de mamíferos que confere uma maior flexibilidade nessa região (**fig.7**) (TIZARD, 2002; SAPHIRE et al., 2002; DUBIE et al., 2015).

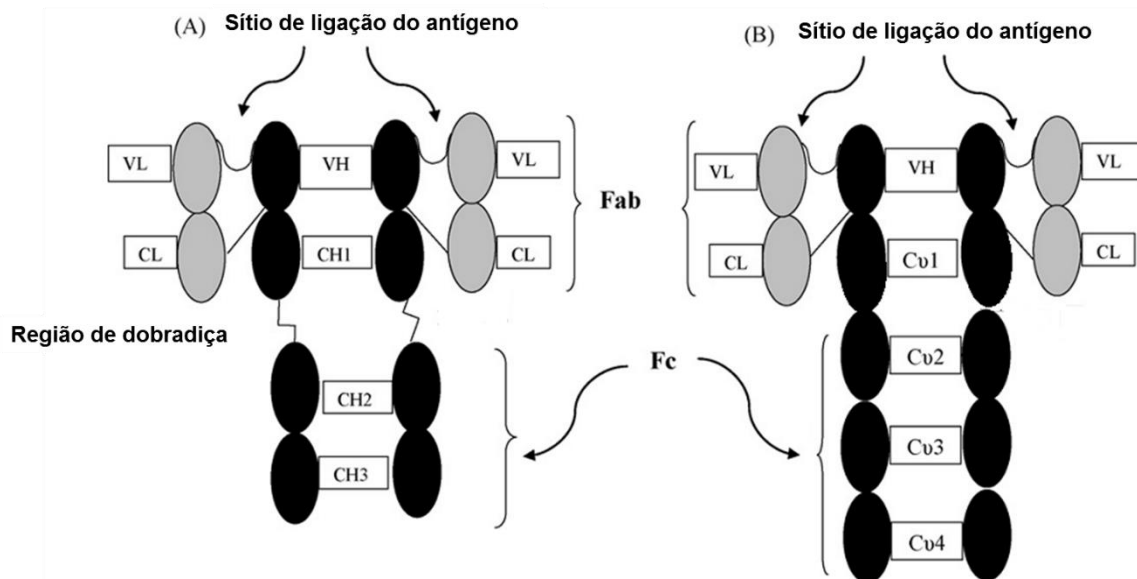


Figura 7: Estrutura das imunoglobulinas. **A:** IgG de mamífero: VH, domínio variável da cadeia pesada; VL, domínio variável da cadeia leve; CL, domínio constante da cadeia leve; CH1, CH2 e CH3, domínios constantes da cadeia pesada. **B:** IgY de aves: VH, domínio variável da cadeia pesada; VL, domínio variável da cadeia leve; CL, domínio constante da cadeia leve; Cu1, Cu2, Cu3 e Cu4, domínios constantes da cadeia pesada.

As estruturas das imunoglobulinas G e Y contendo os domínios (Fab)₂ e Fc são responsáveis por se ligar ao antígeno, e por funções de imunogenicidade altamente relacionada com as reações de hipersensibilidade, respectivamente. Para minimizar essas reações os anticorpos podem ser digeridos com papaína ou pepsina. A digestão das IgGs (**fig.8**) com a pepsina que provoca a liberação

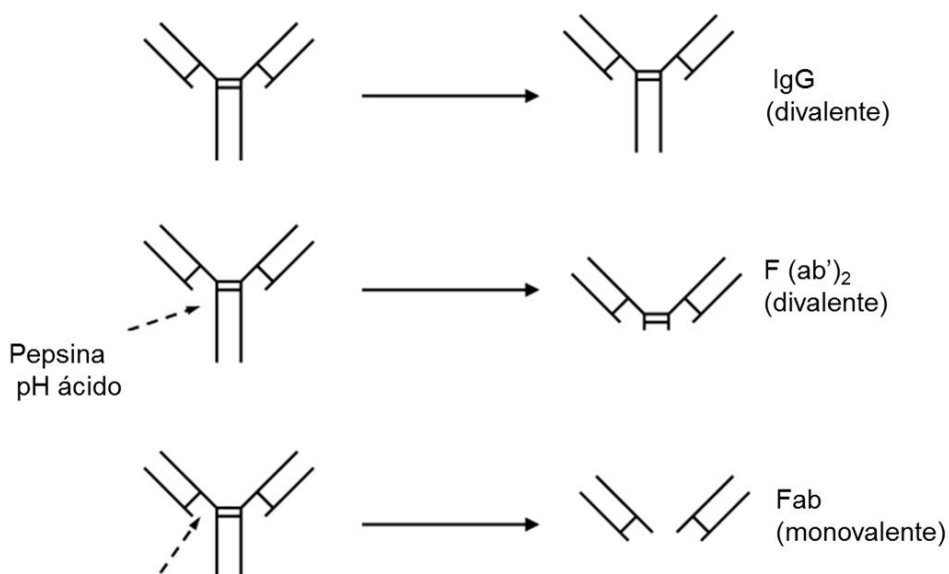


Figura 8 Representação da molécula de Imunoglobulina e seus fragmentos após clivagem com pepsina (B) ou papaína (C). Fonte: Gutiérrez e colaboradores (2011).

das unidades (Fab)₂ é vantajosa pois mantém inalterada a capacidade neutralizante dos anticorpos, e se elimina a possibilidade de reação de hipersensibilidade, porém, ainda é possível que hajam reações de hipersensibilidade do tipo III ou doença do soro (CARDOSO, 2003).

Como alternativa ao uso de (Fab)₂ é feita a clivagem das da IgGs com papaína que resulta na liberação de fragmentos Fab (**fig.8**), o que torna quase remota a possibilidade de reações indesejadas durante seu uso. A grande desvantagem desse tipo de soro é a sua rápida eliminação dado ao tamanho reduzido das moléculas, sendo necessário maior número de aplicações (CARDOSO, 2003). Os soros antiofídicos comerciais, como o CroFab e o ViperaTah, são anticorpos policlonais tratados de ovinos que apresentam apenas o fragmento Fab (ELBAKRI et al., 2010).

A composição quantitativa e qualitativa das peçonhas pode variar de acordo com a espécie, distribuição geográfica, idade, período sazonal e dieta da serpente (DALTRY et al., 1996, RODRIGUES et al., 1998; CHIPPAUX et al., 1991; MACKESSY et al., 2003; EARL et al., 2006) e dessa forma pode gerar um problema adicional para a produção do soro antiofídico abrindo perspectivas para novas abordagens terapêuticas para o sucesso do tratamento do envenenamento ofídico. Neste contexto, várias pesquisas científicas têm sido desenvolvidas e descritas na literatura com o enfoque de neutralizar peçonhas ou toxinas isoladas de modo a buscar outras ferramentas e/ou meios alternativos para o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica antiofídica mais eficaz, segura e acessível (LOMONTE et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2010). Assim, surgem pesquisas voltadas a produção de derivados de anticorpos e ou seus fragmentos (F(ab')₂, Fab, scFv) obtidos por digestão enzimática ou por técnicas de DNA recombinante; e também a utilização de diferentes combinações destes fragmentos (scFv dímeros, scFv em conjuntos, nanocorpos de scFv, nanocorpos da porção humana Fc) (ESPINO-SOLIS et al., 2009; CARDOSO et al., 2008).

Aplicação destes fragmentos de imunoglobulinas na soroterapia experimental foi demonstrado por RONCOLATO e colaboradores (2014). Os autores demonstraram que fragmentos recombinantes de anticorpos humanos produzidos contra a peçonha de *Bothrops jararacussu* foram capazes de reconhecer outras peçonhas do gênero *Bothrops* sp. Tais anticorpos foram obtidos pela técnica de *phage display* com o uso da biblioteca de *Griffin.1*, a qual

é previamente produzida em laboratórios contendo clones de fragmento variável de cadeia única (scFv) de anticorpos humanos, com capacidade de inibir as atividades fosfolipásica e miotóxica de *B. jararacussu*.

A utilização de anticorpos policlonais (IgG e IgY), monoclonais e ou seus fragmentos tornam-se ótimas ferramentas para estudos antivenômicos que permitem obter maior conhecimento acerca de quais toxinas são mais expressas em determinadas espécies e, com isso, tal abordagem pode abrir caminhos para novas pesquisas que visam o aperfeiçoamento na produção dos soros antiofídicos CALVETE et al, 2009; GUTIÉRREZ et al, 2009; ZELANIS et al., 2009; BOLDRINI-FRANÇA, 2010).

1.3 PROTEÔMICA E ANTIVENÔMICA

Há mais de 100 anos os antivenenos têm sido produzidos por métodos tradicionais de imunização de mamíferos de grande porte com misturas de peçonhas de serpentes (WHO, 2010; GUTIERREZ et al, 2011, ANDREAS et al., 2015). Com o advento de técnicas de proteômica e transcriptômica na análise molecular de venenos (venômica) e antivenenos (antivenômica) (CALVETE, 2011; CALVETE et al., 2014), e com estudos de avaliação toxicológica, houve uma compreensão mais profunda da composição dos venenos e da eficácia de seus antivenenos.

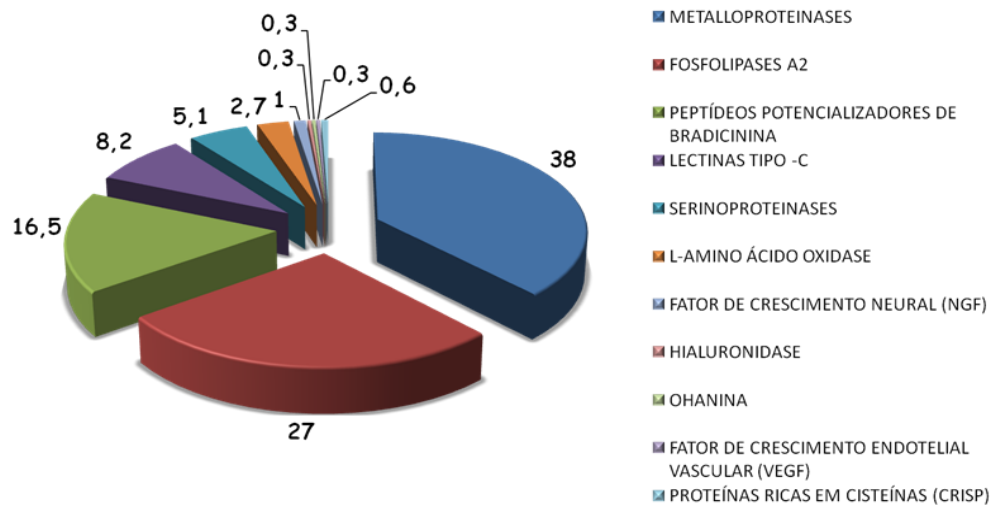
A proteômica de venenos animais (venômica) em conjunto com a antivenômica (identificação de epítomos contidos nas proteínas das peçonhas reconhecidos pelo soro antiveneno por técnicas de proteômica) estudam diferentes peçonhas e venenos, e assim verificam quais componentes estão em abundância e se há variabilidades inter- e intraespecíficas na composição das mesmas, abrindo caminhos para estudos que possam melhorar o tratamento dos envenenamentos (CALVETE et al, 2009; GUTIÉRREZ et al, 2009; ZELANIS et al., 2009; BOLDRINI-FRANÇA, 2010; VEJAYAN; SHIN YEE; PONNUDURAI; AMBU; IBRAHIM, 2010; BERNARDES et al., 2013; VEJAYAN; KHOON; IBRAHIM, 2014; PETRAS et al., 2015).

Estudos proteômicos e transcriptômicos revelaram que dentre as toxinas com alta atividade enzimática, as metaloproteases são as mais expressas em serpentes viperideas. Núñez e colaboradores (2009) assim como Valente e colaboradores (2009) demonstraram em seus estudos os perfis de RNAs

transcritos e proteico das peçonhas de *Bothrops insularis* e *Bothrops atrox* onde as metaloproteases foram predominantes, assim como para os perfis transcriptômicos da peçonha de *Bothrops jararaca* (CIDADE et al, 2006), outros estudos posteriores também corroboraram com esses dados.

Rodrigues e colaboradores (2012) utilizando a combinação de técnicas proteômicas e de análises do transcriptoma mostraram que a peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* apresenta alta expressão de metaloproteases (**fig.9**). A peçonha de *B. pauloensis* vem sendo explorada há mais de 10 anos por nosso grupo de pesquisas, a partir desses estudos várias toxinas já foram isoladas e caracterizadas estruturalmente e funcionalmente (**tabela 1**). Apesar da grande diversidade de metaloproteases presentes nessa peçonha (RODRIGUES et al., 2012) (**Fig.9**), apenas três metaloproteases foram isoladas, BpMP-I, BpMP-II e Bothropoidina (NAVES DE SOUZA et al., 2012; ACHÊ et al., 2015; GOMES et al., 2015).

A. TRANSCRIPTOMA



B. PROTEOMA

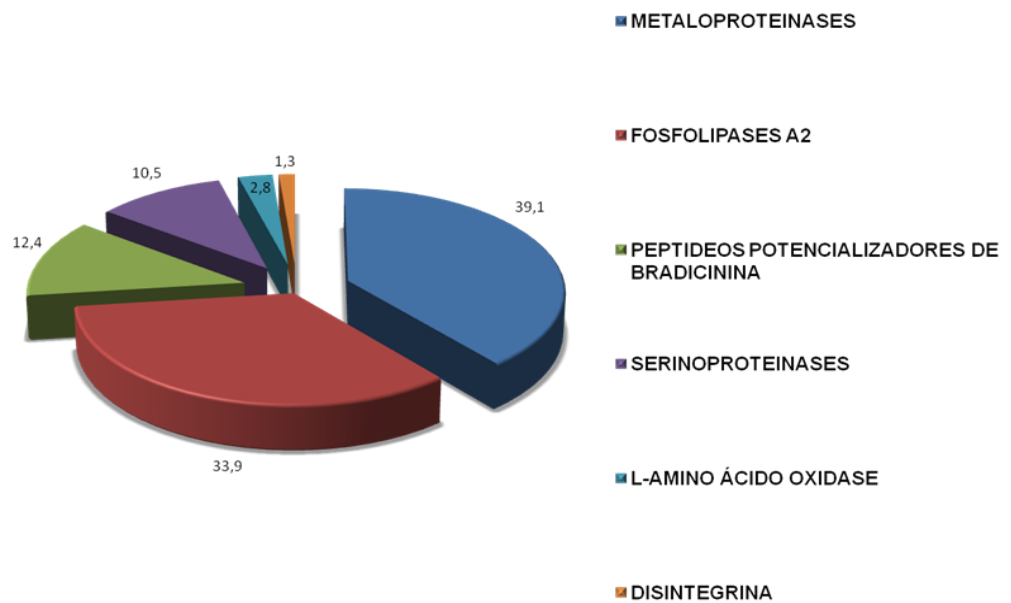


Figura 9: Análise venômica da peçonha de *B. pauloensis*. (A) Transcriptoma e (B) Proteoma
 Fonte: Rodrigues et al., 2012

Tabela 1 Efeitos farmacológicos e terapêuticos de toxinas isoladas de *B. pauloensis*

Classe	Toxina	Efeito Farmacológico	Efeito Terapêutico
	BnSP-6	Miotoxidade	Bactericida e Leishmanicida
PLA₂	BnSP-7	Miotoxidade Neurotoxidade Inflamação Edematogênica Necrose	Bactericida e Leishmanicida
	BnpTX-I e BnpTX-II	Citotoxidade Miotoxidade Neurotoxidade	Bactericida
	BpPLA ₂	Miotoxidade Edematogênica	-
	BpPLA ₂ TX-I	Miotoxidade Edematogênica	Efeito anti-tumoral e inibição da agregação plaquetária
Metaloprotease	Botropoidina	Miotoxidade hemorrágica	Inibição da agregação plaquetária
	BpMP-I	Não hemorrágica	Fibrinogenolítica
	BpMP-II	Citotoxidade	Anti-angiogênica e Fibrinogenolítica
Serino protease	BpSP-I	-	Fibrinogenação
Lectina tipo-C	BpLec	-	Bactericida Antiparasitaria
LAO	Bp-LAO	-	Bactericida, Leishmanicida Anti-tumoral Inibição da agregação plaquetária,

Adaptada de Rodrigues e colaboradores 2015

1.4 BpMP-I – Metaloprotease da classe P-I

A metaloprotease BpMP-I foi isolado por Naves de Souza e colaboradores da peçonha de *Bothrops pauloensis* (*B. pauloensis*) através da combinação de duas etapas cromatográficas, uma troca iônica em CM-Sepharose *Fast Flow* seguida de uma gel filtração em Sephacryl- S300. A proteína BpMP-I é formada apenas pelo domínio metaloprotease, e portanto classificada como sendo da classe P-I das SVMPs. Além disso apresenta alta similaridade com outras SVMPs da classe P-I (**fig.10**), como a BaP1 (WATANABE et al., 2003), Leucurolisina-a (BELLO et al., 2006) e com BpMP-II (ACHÊ et al., 2014).

A BpMP-I apresenta massa molecular de aproximadamente de 23kDa em condição redutora realizada em PAGE-SDS e 20kDa em condição não redutora. A metaloprotease BpMP-I apresenta ainda atividade proteolítica sobre a azocaseína, as cadeias α A e β B do fibrinogênio, não causa hemorragia e dentre as metaloproteases purificadas da peçonha de *B. pauloensis*, é a que apresenta maior recuperação proteica (NAVES DE SOUZA et al., 2012). Dado ao seu bom rendimento proteico e homologia estrutural com domínios metaloproteases presentes em diferentes SVMPs e MMPs, essa toxina se torna um interessante antígeno para a produção de anticorpos para serem utilizados na compreensão da composição de peçonhas animais; no enriquecimento dos soros antiofídicos e na identificação de metaloproteases que possam estar envolvidas em vários processos fisiológicos e ou patológicos.

Com base nessa abordagem o presente estudo demonstrou a produção de anticorpos policlonais anti- metaloprotease BpMP-I produzidos em camundongos e em galinhas com o objetivo de avaliar os seus potenciais de reconhecimento de proteínas presentes em peçonhas botrópicas a fim de propor uma estratégia de enriquecimento do soro antiofídico com anticorpos anti-metaloprotease para a melhoria da soroterapia. Adicionalmente, verificou-se também o potencial desses anticorpos em neutralizar a atividade hemorrágica da peçonha de *B. pauloensis* bem como de reconhecer proteínas presentes no secretoma de células tumorais visando uma alternativa futura para a sua aplicação em testes de ação antitumoral.

	10	20	30	40	50		
BpMPI	-----	-----	-----	----YIELAV	VADHGMFTKY		
Neuwiedase	-----	-----	-----QQR	FPQRYIELVI	VADRRMYTKY		
Leuc-A	-----	-----	-----	-SPRYIELVV	VADHGMFKKY		
Atroxlisina-I	-----	-----	-----TPEQ	--QRYVDLFI	VVDHGMFMKY		
BaP-1	-----	-----	-----QQR-	FSPRYIELAV	VADHGIFTKY		

	60	70	80	90	100		
BpMPI	NSNVNTIRTW	VHEMVNSLNG	FFRSMKVDAS	LVNLEVWS--	-----		
Neuwiedase	NSDSNKIRTR	VHELVNTVNG	FFRSMNVDAS	LANLEVWSKK	DLIKVEKDSS		
Leuc-A	NSNLNTIRKW	VHEMLNTVNG	FYRSMNVDAS	LVNLEVWSKK	DLIKVEKDSS		
Atroxlisina-I	NGNSDKIRRR	IHQMVNIMKE	AYSTMYIDIL	LTGVEIWSNK	DLINVQPAAP		
BaP-1	NSNLNTIRTR	VHEMLNTVNG	FYRSVDVHAP	LANLEVWSKQ	DLIKVQKDSS		

	110	120	130	140	150		
BpMPI	KTLTSFGGEWR	--DLLPRISH	DHAQLLTIV	FDQQTIGIAY	TAG-----		
Neuwiedase	KTLTSFGGEWR	ERDLLRRKSH	DNAQLLTAID	FNGNTIGRAY	LGSMCNPKRS		
Leuc-A	KTLTSFGGEWR	ERDLLPRISH	DHAQLLTVIF	LDEETIGIAY	TAGMCDLSQM		
Atroxlisina-I	QTLDSFGGEWR	XXXXXXXXKSH	DNAQLLTDTD	FDQVTINLAY	TGSMCDLNKS		
BaP-1	KTLKSFGGEWR	ERKLLPRISH	DHAQLLTAVV	FDGNTIGRAY	TGGMCDPRHS		

	160	170	180	190	*	200	
BpMPI	-----	---VAVTMAH	ELGHNLCMDH	D-DTCTCGAK	SCIMASTISK		
Neuwiedase	VGIVQDHSEPI	NLLVGVVMAH	ELGHNLCMEH	DGKDCCLCGAS	LCIMSPGLTD		
Leuc-A	VAWGQDY---	---VAVSMAH	ELGHNLCMRH	DGNQCHCNAP	SCIMADTLSK		
Atroxlisina-I	TGVIQDHSEQ	DLMVAITMAH	ELGHNLCGISH	DTGSCSCGGY	SCIMSPVLSH		
BaP-1	VGVVRDHSKN	NLWVAVTMAH	ELGHNLCIHH	DTGSCSCGAK	SCIMASVLSK		

	210	220	230	240			
BpMPI	GLSFEFSDCS	QNQYQTYVTK	HNPQCILNK-	-----	-		
Neuwiedae	GPSYEFSDCS	KDYYQTFILN	HNPQ-----	-----	-		
Leuc-A	GLSFEFSDCS	QNQYQTYLTK	HNPQCILNKP	-----	-		
Atroxlisina-I	EPSKYFSDCS	YIQWDFIMK	ENPQCILNKR	-----	-		
BaP-1	VLSYEFSDCS	QNQYETYLTN	HNPQCILNKP	-----	-		

Figura 10: Alinhamento das seqüências (ClustalW) entre a BpMP-I e outras metaloproteases de peçonhas de serpentes. Resíduos conservado destacados em amarelo, resíduo Met está marcado com “*”, resíduos de cisteína estão com fonte em vermelho e os resíduos do sítio catalítico destacados em azul. Número de acesso no SWISS-PROT: Neuwiedase (Q919R4); Leucurolisina-A (P84907); Atroxlisina-I (P85420); BaP-1 (P83512). Fonte: Adaptado de Naves de Souza e colaboradores (2012).

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral produzir anticorpos policlonais anti-metaloprotease (BpMP-I, isolada da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*) em camundongos Balb/c e em galinhas da raça *White Leghorn* e avaliar seu potencial em estudos proteômicos; na neutralização das atividades proteolíticas da peçonha de *B. pauloensis* e na identificação de metaloproteases endógenas.

2.2. Objetivos específicos:

- Purificar a metaloprotease (BpMP-I) presente na peçonha de *B. pauloensis*;
- Avaliar a homogeneidade da metaloprotease BpMP-I;
- Produzir anticorpos (policlonais) específicos para a metaloprotease BpMP-I através da indução imunogênica em camundongos BALB/c e galinhas da raça *White Leghorn*;
- Purificar os anticorpos (policlonais IgG e IgY) anti-BpMP- I;
- Avaliar a imunorreatividade desses anticorpos frente diferentes peçonhas botrópicas por meio de ensaios de ELISA e *western blotting*;
- Verificar o potencial neutralizador de anticorpos policlonais anti-metaloprotease (BpMP-I) sobre atividades proteolíticas *in vitro* e *in vivo*;
- Construir colunas de afinidade CNBr-Sepharose acoplada às imunoglobulinas G e Y anti-metaloprotease BpMP-I;
- Purificar metaloproteases da peçonha de *B. pauloensis* utilizando as colunas de afinidade acopladas aos anticorpos anti BpMP-I (IgG e IgY);
- Analisar por eletroforeses unidimensionais e bidimensionais as proteínas aderidas às colunas de afinidade;
- Sequenciar por espectrometria de massas em MALDI-TOF-TOF os spots selecionados nos géis bidimensionais;

- Identificar as sequencias das metaloproteases isoladas por ferramentas de bioinformática;
- Verificar possíveis reconhecimentos dos anticorpos policlonais anti-BpMP-I no secretoma de células tumorais MACL-1 (linhagem primária de câncer de mama) por ensaios de *western blotting*.

***III.* MATERIAIS E MÉTODOS**

3.1 Obtenção das peçonhas e animais

As peçonhas das serpentes *Bothrops pauloensis* (Bp), *Bothrops jararaca* (Bj), *Bothrops atrox* (Ba), *Bothrops diporus* (Bd) e *Crotalus durissus colillineatus* (Cdc) foram obtidas a partir de espécimes mantidas no serpentário Bioagentes, Batatais, São Paulo, Brasil. Após a coleta, as peçonhas foram liofilizadas e conservadas a -20°C. A toxina BnSP-7 foi doada para os teste pelo grupo Labitox (Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais – Universidade Federal de Uberlândia).

Camundongos machos da linhagem isogênica Balb-c (18 a 25g), com 6 semanas de idades, foram obtidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da UFU com água e suplemento alimentar *ad libitum*, a uma temperatura de 22 ±1°C, luminosidade controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e padrão sanitário convencional. As galinhas da raça *White Leghorn* (1,0 a 1,5 Kg), com aproximadamente 25 semanas de idade, foram gentilmente doadas pela Granja Planalto – Uberlândia/MG. As aves foram alojadas em gaiolas de arame suspensas e supridas com ração de postura e água *ad libitum*. Os cuidados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA, número do protocolo 063/08) da Universidade Federal de Uberlândia e estavam em acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/ Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (COBEA/SBCAL).

3.2 Reagentes

Colunas cromatográficas CM-Sepharose, Sephacryl S300, Proteína G Hitrap (5mL) e IgY Hitrap HP (5mL) foram obtidas da Amersham Biosciences do Brasil. Acrilamida, bis-acrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamino (TEMED), dodecilsulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, azul de bromofenol, obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Os demais reagentes eram de grau analítico.

3.3 Isolamento da Metaloprotease BpMP-I

A metaloprotease BpMP-I foi purificada da peçonha de *B. pauloensis* segundo a metodologia previamente descrita por Naves de Souza et al., 2012 sem modificações. Brevemente, cerca de 200 mg da peçonha de *B. pauloensis*

foi ressuspensa em 2mL do tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M pH 7,8. Posteriormente, centrifugada à 100xg por 10 min, à 4° C e o sobrenadante límpido retirado foi aplicado em uma coluna contendo resina CM-Sephacryl *Fast Flow*, previamente equilibrada no mesmo tampão AMBIC. As frações eluídas por um gradiente linear de tampão AMBIC 0,05M a 0,5M (pH 7,8), em temperatura ambiente, foram coletadas em 1mL/tubo em fluxo de 6,5mL/h por um coletor de frações Redifrac (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). As frações contendo a metaloprotease (BpMP-1) de interesse foram monitoradas através do espectrofotômetro Ultrospec 1000 – Amersham Pharmacia Biotech, absorvância a 280nm, reunidas em pool, dosada, liofilizada e armazenada a -20°C. Em seguida, a amostra de interesse foi fracionada em uma coluna de gel filtração molecular Sephacryl S-300, sendo sua homogeneidade verificada por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa em coluna C-18 (HLC-RP) e eletroforese em gel de PAGE-SDS 12,5% (v/v) em condições redutoras de acordo com o item 3.5.

3.4 Dosagem de proteínas

As concentrações das amostras foram determinadas pelo método de Bradford (1976), com modificações. Nesse método, uma alíquota de cada amostra foi dissolvida para 10µL com água deionizada e adicionados 190µL do reagente de Bradford (100mg de Comassie Blue G, 50mL de etanol 100%, 100mL de ácido fosfórico 85% e água deionizada suficiente para completar 1 litro de solução). As determinações foram feitas em triplicatas e a absorvância medida a 595nm. Paralelamente à dosagem de proteínas foi construída uma curva padrão de soroalbumina bovina (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.

3.5 Eletroforese Unidimensional

As eletroforeses em géis de poliacrilamida sob condições desnaturantes e redutoras foram realizadas de acordo com Laemmli (1970), com modificações. O sistema de PAGE-SDS 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 2,0M 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 das proteínas foram dissolvidas 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 100°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 carbônica 29 kDa; Tripsinogênio 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 20mA 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.

3.6 Produção de anticorpos policlonais anti-BpMP-I

A indução da síntese de anticorpos policlonais IgG foi realizada em camundongos machos da linhagem Balb-c . Esses animais foram divididos em 2 grupos distintos contendo 6 animais: o primeiro grupo recebeu apenas tampão fosfato salino (PBS) com adjuvante (grupo negativo) e o segundo grupo recebeu a toxina com o adjuvante (grupo teste). A produção de anticorpos policlonais IgY foi realizada utilizando galinhas da raça *White Leghorn* modelo experimental. Essas também foram divididas em 2 grupos que continham 2 animais, controle negativo e teste, sendo imunizadas com PBS e toxina, respectivamente.

3.6.1 Imunizações dos camundongos da linhagem isogênica Balb-c

Camundongos foram imunizados de acordo com protocolo pré-estabelecido por Harlow e Lane (1999) com 35 µg/injeção de BpMP-I em um volume final de 0,1mL/camundongo, essa concentração da toxina foi previamente testada e verificou-se que não causava nenhum dano aos animais. No total foram realizadas 4 imunizações com intervalos de 2 semanas, a primeira inoculação foi feita com adjuvante de Freud's completo e as demais com adjuvante de Freud's incompleto (razão 1:1 v/v, solução imunogênica/adjuvante).

As quatro aplicações foram realizadas intraperitonealmente. O grupo negativo seguiu o mesmo modelo de imunização. Para verificar a cinética de produção de anticorpos nos camundongos foram feitas coletas de sangue através da punção submandibular segundo Golde e colaboradores, (2005). Uma semana antes da primeira inoculação de antígeno e sucessivamente uma semana após cada inoculação. Os soros obtidos dessas coletas foram utilizados para verificar a capacidade de reação dos anticorpos à metaloprotease pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indireto como descrito no item 3.9.

3.6.2 Imunizações das galinhas da raça White Leghorn

A indução da produção dos anticorpos policlonais nas galinhas da raça *White Leghorn* foi realizada como reportado por Schade e colaboradores (1996). As imunizações foram realizadas em intervalos de 2 semanas, a primeira dose foi aplicada com adjuvante Freud's completo e as demais com adjuvante Freud's incompleto seguindo a proporção 1:1 (v/v) solução imunogênica/ adjuvante. Em cada inoculação foram utilizados 0,25mg de BpMP-I em um volume final de 0,5ml/ galinha . As aplicações foram realizadas via intramuscular em 4 pontos do peitoral do animal. Os ovos pré-ímmunes e os postados após o início das imunizações foram coletados e refrigerados a 4°C. As gemas então separadas e agrupadas em *pools* de ovos coletados em sete dias de coletas.

Para verificar a cinética de anticorpos produzidos pelas galinhas, também foi adotado o método de ELISA indireto para verificar a reação dos anticorpos produzidos frente a BpMP-I. Inicialmente foi obtido o sangue pré-ímmune por punção da veia localizada na asa esquerda do animal uma semana antes da primeira inoculação, em seguida punções foram realizadas em intervalos de uma semana após cada imunização.

3.7 Preparação do soro e purificação das IgGs

Sete dias após a última inoculação os animais foram sangrados. E para obtenção do soro total, diferentes amostras de sangue obtidas desses animais foram colocadas em tubos *falcon* e então mantidas por 1 hora para a formação do coágulo. Os tubos foram então centrifugados à 600xg por 10min a 4°C. O sobrenadante foi coletado com cuidado evitando a aspensão do coágulo e guardado para realização das cromatografias. Posteriormente, o soro foi

submetido a uma cromatografia de afinidade na coluna proteína G HiTrap para a obtenção das imunoglobulinas G (IgGs) puras. Nesse processo a resina foi previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7, para permitir a interação específica das IgGs presentes no soro. Em seguida, soro foi diluído 2 vezes no mesmo tampão, filtrado em seringa 0,45µm e aplicado no sistema. Foram passados 5 volumes de coluna do tampão de equilíbrio para a retirada das proteínas inespecíficas e, em seguida, foi realizada a eluição dos anticorpos anti-BpMP-I com o tampão 0,1M glicina-HCl, pH 2,7 com um fluxo de 0,5mL/min no sistema Akta prime plus (Amersham Biosciences). Nas frações contendo as IgGs foram adicionados 100µL de Tris-HCl 1M pH 9 para a proteção do estado nativo destas imunoglobulinas. Em seguida as frações enriquecidas dos anticorpos foram dialisadas, liofilizadas e armazenadas a - 20°C (WALKER, 1996). Os anticorpos policlonais IgG foram também analisados em PAGE-SDS 12,5% de acordo com o item 3.5.

3.8 Preparo do extrato proteico da gema e isolamento das IgYs

As gemas coletadas no período experimental foram separadas e agrupadas em *pools* de ovos coletados no período de 7 dias. Inicialmente, foram diluídas segundo protocolo de Akita e Nakai (1993) com modificações. Foi utilizada água deionizada na proporção 1:15 para a diluição e o pH da solução ajustado para 5,5 com tampão acetato 0,06M pH 4,8. Depois a solução de ovo foi mantida a 4°C *overnight*. No dia seguinte, a solução foi centrifugada à 800xg por 40min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e filtrado com membrana 0,45µm para a completa retirada dos lipídios (**fig.11**).

O pH do filtrado foi ajustado para 7,4 sob agitação com hidróxido de sódio. Após a delipidação, foi realizada a precipitação com sulfato de amônio para a concentração final 20% (m/v) (ARAÚJO et al., 2010). Esta solução de ovo foi mantida sob agitação por 45min a 4°C, fazendo com que as imunoglobulinas contidas na solução precipitassem. Decorrido o tempo de agitação a solução foi centrifugada por 20min a 4°C a 2000xg (**fig.11**).

O precipitado foi lavado em sistema de ultrafiltração (AMICON YM 30) com tampão fosfato de sódio 0,02M, K₂SO₄ 0,5M, pH 7,5 e fracionado na coluna IgY HiTrap HP previamente equilibrada com o mesmo. Os anticorpos foram eluídos utilizando gradiente linear de tampão fosfato de sódio 0,02M, pH 7,5 a

um fluxo de 0,5mL/min no sistema Akta prime plus (Amersham Biosciences). As frações contendo as IgYs foram dialisadas, liofilizadas e mantidas à -20°C. Em seguida foram analisadas em PAGE-SDS 12,5% de acordo com o item 3.5.

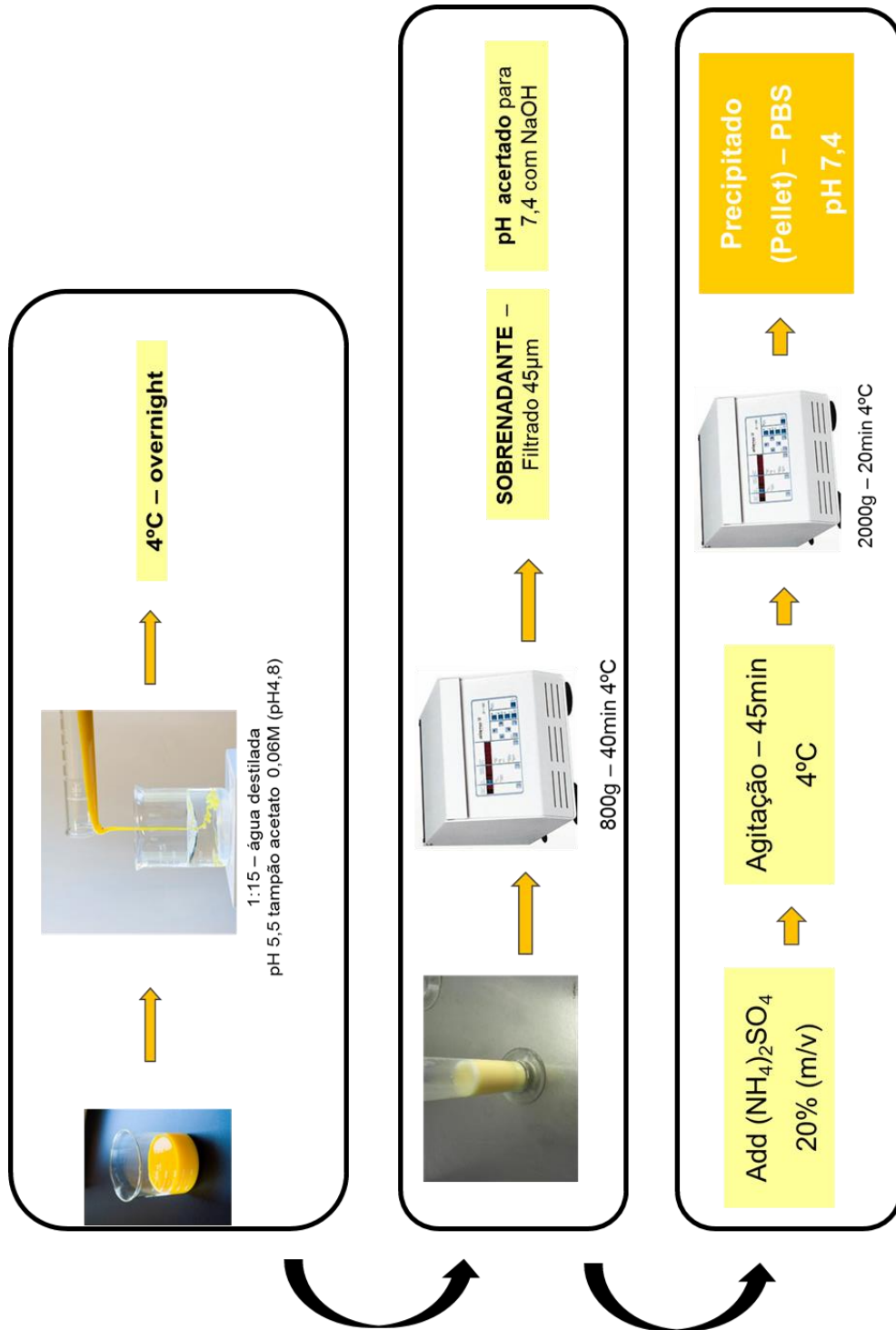


Figura 11: Esquema geral para a obtenção do extrato concentrado de proteínas do ovo contendo as imunoglobulinas IgYs..

3.9 Ensaio de imunorreatividade por ELISA

A titulação das amostras de soro dos camundongos imunizados entre os dias 0 e 42, assim como a reatividade específica contra a BpMP-I, foram determinadas pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), usando placas de 96 well (Nunc Maxisorp F8, Life Technologies Limited, Paisley, UK) sensibilizadas com 100µL de antígeno (toxina na concentração 10µg/mL em 0,06M NaHCO₃, pH 9.6). A placa foi incubada *overnight* a 4°C, então lavada três vezes com TBS-T (0,020M TRIS + 0,385M NaCl + 0.05% Tween 20) e bloqueada com 3% de leite em pó desnatado em TBS-T por 1 h a 37 °C.

Para verificar a titulação das amostras os soros (dia 49) 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 e 1:12800, foram adicionados (100µL/poço) em duplicatas e incubados 2 h a 37°C. A placa foi lavada seis vezes com TBS-T, então incubada por 1h a 37°C com 100µL/poço de Anti-Mouse IgG(Fab Specific) conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, UK, diluídos 1:5000). A revelação foi realizada em solução cromogênica ortofenileno-diamina (OPD) a 1mg/mL, diluída 50µL de tampão substrato (0,1M ácido cítrico, 0,1M acetato de sódio, pH 5,4, contendo 0.1% H₂O₂), por 10 minutos. A reação foi interrompida com 25µl de H₂SO₄ a 0,1M e a absorbância a 490nm foi registrada usando em leitora de microplacas (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer - Thermo Scientific – USA). A taxa da densidade óptica (DO) do soro imune foi determinada para os grupos de camundongos, assim como para verificar se os anticorpos apresentavam reatividade cruzada contra um antígeno inespecífico (BnSP-7, fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. pauloensis*) e as peçonhas brutas das serpentes *B. pauloensis*, *B. jararaca*, *B. atrox*, *B. diporus* e *C. durissus colillineatus* (Cdc).

O mesmo procedimento também foi utilizado na realização da titulação do anti-soro produzido nas galinhas, assim como no extrato da gema para verificar a transferência de anticorpos. Também foi verificada a reatividade cruzada entre as imunoglobulinas Y purificadas contra diferentes peçonhas brutas e a PLA₂ BnSP-7.

Para determinar o cálculo de *cut off* e do índice ELISA (IE), em cada placa foram incluídas amostras de anticorpos IgG e IgY (anticorpos dos controles negativos de imunização). O valor de *cut off* foi obtido pela média dos valores de densidade óptica (DO) dos controles negativos mais três desvios padrões.

Os valores foram expressos com IE que foi calculado pela aplicação da seguinte fórmula: $IE = (\text{absorbância da amostra testada} / \text{cut off})$. As amostras cujos $IE > 1,2$ foram consideradas reativas.

3.10 Western Blotting

As proteínas presentes nas peçonhas das serpentes *B. pauloensis*, *B. jararaca*, *B. atrox*, *B. diporus* e *C. durissus colillineatus* (Cdc), sob condições redutoras e não redutoras foram submetidas a eletroforeses PAGE-SDS (item 3.5) e posteriormente eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond™-P membrane (GE Healthcare) utilizando um sistema de eletrotransferência (Hoefer GE Healthcare). A eficiência da eletrotransferência foi avaliada pela coloração das membranas de nitrocelulose com Ponceau-S Red. As membranas foram então descoradas com água, incubadas com leite desnatado 2,5% em NaCl 0,12M e fosfato de sódio 0,04M pH 7,2 (tampão de bloqueio), por 1 hora a temperatura ambiente para bloquear sítios não específicos. Posteriormente, as membranas foram incubadas *overnight* a temperatura ambiente com os anticorpos anti-BpMPI (IgG e IgY) diluídos 1:1000 (v/v) na solução de bloqueio. Após 5 lavagens com solução de bloqueio contendo 0,05% de Tween-20, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma, 1:5000 em TBS) a temperatura ambiente por uma hora em agitação. No final da incubação a membrana foi então lavada três vezes, e revelada com DAB (3,3 diaminobenzidina Sigma, 0,03% em 0,05M Tris-HCl, pH 7,6, contendo 0,03% H₂O₂).

Os perfis do western blotting foram analisados no programa Image J versão 1.44 (National Institutes of Health, Bethesda, EUA). Gráficos foram gerados com os picos de intensidade das bandas detectadas.

3.11 Validação do potencial neutralizador dos anticorpos policlonais anti-BpMP-I

3.11.1 Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. pauloensis*

O ensaio de atividade hemorrágica foi realizado segundo método descrito por Nikai e colaboradores (1984) com modificações. A hemorragia foi induzida por injeções intradérmicas (i.d.) utilizando 5 μ g da peçonha de *B. pauloensis* no dorso de camundongos Balb/c machos (n=4). Esta dose é suficiente para formar um halo hemorrágico de 10mm² (dose mínima hemorrágica, DMH) (LUCENA; MENDES; HOMSI-BRANDEBURGO, 2009). Os halos hemorrágicos foram medidos utilizando-se um paquímetro de baixa pressão (CALIPER).

Os ensaios de neutralização foram realizados utilizando a peçonha bruta de *B. pauloensis* incubada com os anticorpos anti-BpMP-I nas razões 1:20 e 1:50 (m/m, antígeno/anticorpo) e os grupos controles receberam apenas a peçonha ou salina. Todas as amostras foram previamente incubadas por 30min a 37°C. Após esse período as amostras com os anticorpos foram aplicadas no dorso dos animais, além dos controles negativo (PBS) e positivo (peçonha). Após três horas, os animais foram anestesiados com soluções de ketamina® 10% (0,05ml/kg) + xilasina® 2% (0,025ml/kg) e posteriormente eutanasiados. As peles foram removidas e os halos hemorrágicos medidos.

3.11.2 Inibição da atividade azocaseinolítica da metaloprotease BpMP-I

O efeito dos anticorpos sobre a atividade proteolítica de 1,086 μ M BpMP-I (NAVES DE SOUZA et al., 2012) foi determinada preparando-se previamente a enzima com diferentes concentrações de anticorpos anti-BpMP-I (grupo teste) e anticorpos irrelevantes (grupo controle negativo), seguindo as seguintes razões 1:0; 1: 1; 1: 2,5; 1: 5 (toxina:anticorpos, μ M/ μ M). Após o preparo as amostras foram incubadas por 1h a 37°C. Em seguida, a atividade proteolítica sobre a azocaseína foi realizada como descrito por Gomes e colaboradores (2011), com modificações. A solução de azocaseína (1mg/mL) foi preparada com tampão Tris 0,05M e NaCl 0,15M, pH 7,8, e adicionada em uma placa de 96 poços (160 μ L/poço). (NUNC MaxiSorp) Para iniciar a reação foram adicionadas 45 μ L da solução toxina:anticorpo (n=6) e mantidas por 30 minutos a 37°C. A reação finalizada ao

acrescentar 45µL da solução de ácido tricloroacético 20% (m/v). A placa ficou em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente centrifugada a 1856xg por 20min. O sobrenadante transferido e a absorbância determinada a 366nm na leitora de placas (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer - Thermo Scientific –USA). Os ensaios foram realizados em triplicatas. O resultados foram transformados em porcentagem de inibição e plotados em gráfico

3.12 Imobilização de anticorpos (IgG/ IgY anti-BpMP-I) em matriz CNBr-Sepharose

As colunas ligadas com anticorpos anti-BpMP-I (IgG/IgY) foram preparadas de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare). Previamente, 1g da resina CNBr- Sepharose 4B foi suspensa em solução de HCl 0.001M, mantida sob leve agitação por 15min e, em seguida, centrifugada por 3000xg por 5min à 4°C. Posteriormente, a resina ativada foi lavada com tampão de acoplamento (0,2M NaHCO₃, 0,5M NaCl, pH 8,3) e centrifugada a 3000xg por 5min à 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante descartado e a resina transferida para a solução de ligantes previamente preparada na concentração final de 0,6mg/mL de anticorpos (IgG anti-BpMP-I ou IgY anti-BpMP-I) e mantidas sobre leve agitação a 4°C *overnight*. O derivado anticorpo-CNBr foi lavado com tampão de acoplamento para a retirada do excesso de ligante, em seguida, centrifugado a 3000xg por 5min à 4°C. Para bloquear os sítios de ligação remanescentes, a resina foi transferida para o tampão de bloqueio (Etanolamina 1M pH 8) e agitada lentamente por 2 horas à temperatura ambiente. Finalizado o processo de acoplamento, a resina de anticorpos foi colocada em coluna e lavada 5 vezes alternadamente com tampão Acetato 0,1M pH 4,0 contendo NaCl 0,5M e com tampão de acoplamento.

3.13 Purificação de proteínas ligantes aos anticorpos IgG e IgY anti-BpMP-I da peçonha de *Bothrops pauloensis*

3.13.1 Preparo da amostra

A peçonha bruta de *B. pauloensis* (20mg) foi ressuspensa em 1mL de tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7.5 e centrifugada a 100xg por 10min à 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e aplicado nas colunas de afinidade previamente preparadas.

3.13.2 Cromatografia de afinidade

Para a obtenção das proteínas ligantes aos anticorpos IgG e IgY anti-BpMP-I foi realizado o fracionamento da peçonha bruta *B. pauloensis* nas duas colunas previamente montadas (IgG Sepharose e IgY Sepharose). As colunas de afinidade foram previamente equilibradas com tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7.5, e em seguida a amostra preparada segundo item 3.13.1 foi aplicada nas colunas. As frações foram coletadas por um coletor de frações Redifrac em fluxo de 20 gotas/tubo. Posteriormente, as frações foram monitoradas através do espectrofotômetro Ultrospec 1000- Amersham Pharmacia Biotech com absorvância a 280nm. Os *pools* das frações ricas em metaloproteases foram dialisados, dosadas, divididas em microtubos contendo diferentes concentrações e armazenados a -80°C. As amostras foram submetidas às análises eletroforéticas em géis unidimensionais e bidimensionais, de acordo com itens 3.5 e 3.14 respectivamente.

3.14 Eletroforese Bidimensional (2DE)

3.14.1 Preparo das amostras

A eletroforese bidimensional foi realizada de acordo com o método O'Farrel (1975) com adaptações. Alíquotas de 150ug das frações ligantes das colunas de afinidade foram precipitadas com 3 volumes de acetona gelada e mantidas à -20°C por 2 horas. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 10000xg por 20min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* após secagem foi ressuspenso com 250uL de tampão de reidratação contendo 7M ureia, 2M tiourea, 2% CHAPS, 0,5% de anfólitos livres (IPG buffer, pH 3-10) e 0,002% de azul de bromofenol.

3.14.2 Primeira dimensão – focalização isoelétrica

As amostras em tampão com os anfólitos foram dispostas em canaletas individuais da bandeja de reidratação (uma amostra por canaleta - IPGbox). Sobre as amostras foram colocadas uma tira de gel em poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado linear de 3-10 (Immobiline DryStrip gel – IPGs; GE Lifesciences, USA) de 13 cm de comprimento. E permaneceram nessa solução no mínimo 16 horas a temperatura ambiente e protegida da luz. Ao final da reidratação as fitas

foram removidas da bandeja e posicionadas no equipamento Ettan IPGphor (GE Healthcare) e cobertas com solução de óleo mineral para a focalização. Em seguida a focalização isoeletrica (IEF) foi realizada com a seguinte programação: 1ª etapa: 100V (1hora); 2ª etapa: 500V (500Vh); 3ª etapa: 1000V (800Vh) com aumento gradual da voltagem; 4ª etapa: 8000V (11300Vh) com aumento gradual da voltagem; 5ª etapa: 8000V (5400Vh); 6ª etapa: 50V por 2 horas, a 20°C com corrente máxima de 50mA/fita.

3.14.3 Preparo das fitas focalizadas – Redução e Alquilação

Ao término da focalização isoeletrica, imediatamente antes da segunda dimensão, as fitas com as proteínas eletrofocalizadas foram submetidas a uma etapa de equilíbrio. Nesta etapa as fitas foram saturadas em tampão desnaturante contendo o detergente aniônico dodecil-sulfato de sódio (SDS). O SDS promove a desnaturação das proteínas presentes na amostra e forma complexos SDS-proteína carregados negativamente, não deixando que a carga elétrica das proteínas venha a interferir na corrida eletroforética. Um agente redutor, o ditioneitol (DTT), responsável por romper as pontes dissulfeto dos polipeptídeos, também foi adicionado. Ao serem tratadas com ambos, SDS e DTT, as proteínas irão migrar no gel de poli-acrilamida e o processo de separação dependerá do peso molecular da proteína. A etapa de equilíbrio das fitas foi executada em dois passos.

No primeiro passo, as fitas foram transferidas e imersas no tampão de equilíbrio composto de 750mM Tris-HCl pH 8.8, 6M de ureia, 30% glicerol (v/v), 2% SDS (m/v) e 0.002% de azul de bromofenol (m/v) contendo 10mg/mL de DTT por 15 minutos sob leve agitação. No segundo passo, ao tampão de equilíbrio foi adicionado iodoacetamida (25mg/mL) – o qual protege as proteínas contra a reoxidação- e então as fitas foram novamente imersas e mantidas sob agitação por mais 15 minutos, e então lavadas em tampão Tris-glicina por 5 minutos.

3.14.4 Segunda dimensão – Gel de poli-acrilamida

A segunda dimensão foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando o sistema SE 600 Ruby GE Healthcare conectado ao sistema de refrigeração Multi Temp III. As fitas foram retiradas do tampão tris-glicina, dispostas sobre a superfície dos géis de poli-acrilamida 12,5% e fixadas com solução de agarose 0,5% com

traços de azul de bromofenol. Foi utilizado o marcador de massa molecular da Thermo Scientific: β -galactosidase, 116kDa; Albumina, 66,2kDa; Ovoalbumina, 45kDa; Lactato desidrogenase, 35kDa; Endonuclease de restrição, 25kDa; β -lactoglobulina, 18,4kDa; Lisozima, 14,4kDa. As condições das corridas foram: 250V; 25mA por gel; 100W. A corrida eletroforética foi interrompida quando o azul de bromofenol, presente na solução de agarose, alcançava o fim do gel, aproximadamente 5 horas do início da corrida. Todas as corridas foram realizadas a 15°C. Ao final da segunda dimensão os géis foram fixados *overnight* em solução contendo 50% etanol e 10% ácido acético em água ultra-pura. Em seguida, os mesmos foram lavados em solução com 50% metanol e 10% ácido acético. E, finalmente, os géis foram imersos em solução Coomassie (0,02% PhastGel Blue R; 60% metanol; 10% ácido acético) por aproximadamente 16 horas sob agitação suave.

3.15 Processamento e análise das imagens

Após a descoloração os géis 2D foram digitalizados utilizando o ImageScanner III LabScan 6.0 (GE Healthcare) na resolução de 300dpi, utilizando o modo transparente e filtro verde. As imagens foram salvas em formato e arquivo TIFF e analisadas utilizando o software Image Master Platinum (GE Healthcare). Para cada fração ligante das imunoglobulinas-Sepharose (IgYP2 e IgGP2) foram obtidos três géis bidimensionais, perfazendo um total de 6 imagens. O gel mais representativo foi denominado gel referência. Os valores experimentais de pH e de massa molecular (*Mr*) (referente ao marcador proteico utilizado) foram inseridos em spots específicos nas imagens, permitindo ao software a estimativa dos respectivos valores para os demais spots.

3.16 Remoção da coloração dos spots: Redução e Alquilação

Os spots identificados no item 3.15 foram removidos dos géis, fragmentados e, posteriormente descorados com 0,2mL de acetonitrila 50%(v/v) em água ultra-pura, trocando a solução a cada 15 minutos, o processo foi realizado à temperatura ambiente. Após a remoção da coloração, os mesmos foram desidratados com 0,2mL de acetonitrila (PA). Em seguida, a acetonitrila foi removida das amostras por concentração a vácuo (Speed vac). Posteriormente, as

proteínas contidas nos spots foram reduzidas com 0,1mL de 5mM Tris-2-carboxietil-fosfina (TCEP) em solução de bicarbonato de amônio 100mM, incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Passado esse período, a solução redutora foi removida e aos spots foram adicionados 0,1mL da solução alquilante contendo 10mM de iodoacetamida em bicarbonato de amônio 100mM, pelo mesmo período de incubação da solução redutora. Para a remoção da solução de alquilação os fragmentos foram lavados com a solução de bicarbonato de amônio 100mM e desidratados com acetonitrila PA, esse processo foi repetido por mais 2 vezes e no final a acetonitrila PA evaporada no Speed vac.

3.17 Digestão e extração das proteínas em gel

Os fragmentos de géis foram reidratados com uma solução de bicarbonato de amônio 40mM e 9% de acetonitrila contendo a tripsina (20ug/mL preparada de acordo com o fabricante/ Sigma). O processo de reidratação ocorreu em banho de gelo por 30 minutos e após esse período adicionados 0,05mL solução de bicarbonato de amônio 40mM e 9% de acetonitrila. Confirmado que os *spots* estavam imersos na solução os mesmos foram colocados para incubar a 37°C overnight.

Ao término da digestão, a extração dos fragmentos de peptídeos iniciou-se com a adição de 0,05mL de solução de TFA/ H₂O 0,1% aos spots. Posteriormente, incubados por 10 minutos, centrifugados e o sobrenadante reservado.

Os pellets foram submetidos a duas etapas de lavagens:

- **1ª etapa:** 0,015mL de solução TFA 0,1% em ACN 50% foram adicionados e permaneceram por 10 minutos, posteriormente o sobrenadante coletado.
- **2ª etapa:** adicionados 0,015mL de solução TFA 0,1% em ACN 70% e incubados por 10 minutos, por fim, sobrenadante coletado. Cada etapa foi repetida 15 vezes, e no final, os sobrenadantes do início da extração e das duas etapas foram agrupados e as amostras evaporadas no *Speed vac* até atingir aproximadamente 0,01mL.

Após a extração dos fragmentos de peptídeos, os mesmos foram dessalinizados em micro coluna Zip-Tip (resina C₁₈ P10, Milipore) e em seguidas submetidas a espectrometria de massas.

3.18 Análise por espectrometria de massa

As amostras foram preparadas para análise de MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption ionized Time of Flight- Time of Flight) em um aparelho Autoflex III TM, softwares FlexControlTM e FlexAnalysisTM (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA).

Alíquotas de 0,5µL de cada solução dos fragmentos dessalinizados foram aplicadas em placa *anchorship* 600 (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e em seguida co-cristalizada com 0,5 µL de solução saturada da matrix composta por ácido α-cyano-4-hidroxicinâmico (5 mg/mL de CHCA em acetonitrila 70% / TFA 0,1%) a temperatura ambiente. As amostras foram secadas e o espectrômetro foi operado em modo refletido para obtenção das massas dos fragmentos gerados pela tripsina, e em modo *Lift* para refragmentação de íons para sequenciamento *de novo*.

A calibração externa do modo MS foi realizada utilizando a mistura de peptídeos Peptide Calibration Standard II (bradicinina m/z = 757,39; angiotensina II m/z = 1046,54; angiotensina I m/z = 1296,68; substância P m/z = 1347,73; bombesina m/z = 1619,82; substrato da renina m/z = 1758,93; ACTH (1-17) m/z = 2093,08; ACTH (18-39) m/z = 2465,19; e somatostatina (28) m/z = 3147,47) da Bruker Daltonics, Bilerica (EUA). Os sinais dos íons mais intensos foram selecionados como precursor para aquisição do MS/MS. Os espectros foram armazenados para posterior análise.

3.19 Análise das sequências em banco de dados

Os espectros de massas obtidos de cada *spot* protéico (MS e MS/MS) foram combinados pelo software BioTools (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e posteriormente investigados nos bancos de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI), por meio do software MASCOT® (<http://www.matrixscience.com>). Alguns espectros foram posteriormente analisados pelos softwares FlexAnalysis 3.3.

3.20 Linhagens celulares e manutenção das culturas

As células MACL-1 (linhagem primária de câncer de mama), estabelecidas por Correa e colaboradores (2009), foram mantidas em meio de cultura DMEM alta glicose (SIGMA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) em frascos

de cultura T-75 (TPP®) em estufa úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C (Forma™ 310 – Thermo Scientific).

3.21 Extração do secretoma das células MACL-1

As células MACL-1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com SFB a 10% até atingir uma confluência de 80-90%. Em seguida, esse meio foi removido e adicionado meio DMEM sem suplementação às células e estas foram acondicionadas em estufa úmida contendo 5% de CO₂ a 37°. Passado 24 horas, o meio foi retirado, filtrado em filtro de 0,22µm (Millipore) e concentrado através de sistema de concentração a vácuo (SpeedVac™ Concentrator – Thermo Scientific). A amostra foi reunida, passada em coluna PD-10 Desalting Colum (GE Healthcare Life Sciences) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, coletada em microtubos e concentrada novamente em sistema de concentração a vácuo (SpeedVac™ Concentrator – Thermo Scientific). Por fim foi feita uma estimativa da quantidade de proteínas através da dosagem em equipamento com leitura em UV a uma absorbância de 280nm (NanoVeU Plus™ - GE Healthcare Life Sciences) e essas amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

3.22 Atividade Gelatinolítica

A eletroforese com substrato proteico (gelatina) copolimerizado no gel de poli(acrilamida), foi realizada, de acordo com HEUSSEN & DOWDLE (1980), teve como objetivo identificar a presença de proteases no secretoma das células MACL-1. A amostra proteica utilizada foi o secretoma das células MACL-1, ambas dissolvidas em tampão (Tris-HCl 0,0625M pH 6,8; glicerol a 10%; 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol) em diferentes concentrações (1µg, 2,5 µg, 5 µg e 10 µg. Foi usado padrão de massa molecular 220, 180, 115, 82, 64, 49, 37, 26, 19, 15, 10 e 6 KDa (Invitrogen).

A corrida eletroforética foi realizada com tampão de corrida (TRIS-HCl 0,025 M, Glicina 0,192 M com SDS a 0,1% pH 8,3) sob tensão de 50V a 4°C, sendo aumentada para 150V após 1 hora de corrida. Após o tempo de eletroforese (aproximadamente 1:30) indicado pelo azul de bromofenol ao final do gel, este foi retirado da placa e submerso em solução de triton X-100 2,5% durante 1 hora sob agitação leve para remoção do SDS. Em seguida o gel foi lavado com água

destilada para remover a solução de triton e incubado com tampão fosfato 0,2M pH8,0 por 4 horas a 37°C.

Decorrido o tempo de incubação, os géis foram corados com *Coomassie Blue* R-250 0,2% em solução de ácido acético, metanol e água Milli-Q® na proporção de 1:4:5 (v/v) durante 1 hora, sob agitação leve, e descorados em solução descorante de ácido acético, metanol e água Milli-Q® na mesma proporção, para a revelação das bandas onde houveram atividade proteolítica.

3.23 Imunolocalização de alvos no secretoma de células tumorais

Com o intuito de verificar se os anticorpos policlonais anti-BpMP-I eram capazes de reconhecer metaloproteases em diferentes sistemas biológicos, foi utilizado o secretoma de células tumorais MACL-1 (linhagem primária de câncer de mama) estabelecidas por Correa e colaboradores (2009). Ensaios de western blotting (item 4.10) foram realizados utilizando o secretoma de células tumorais MACL-1 e a BpMP-I (controle positivo da reação), para a identificação de possíveis alvos semelhantes à BpMP-I.

3.24 Análise estatística

A análise estatística e apresentação dos resultados foram realizados através do programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As variáveis foram analisadas com testes específicos, paramétricos ou não paramétricos, segundo a distribuição de dados. Foi considerado estatisticamente diferente quando $p < 0,05$.

***IV.* RESULTADOS**

4.1 Isolamento da metaloprotease BpMP-I

A metaloprotease foi obtida através da combinação de dois passos sequenciais de cromatografias, resina de troca iônica e a resina de gel filtração, respectivamente. Na cromatografia de troca iônica, realizada em uma coluna contendo a resina CM-Sepharose, 200 mg da peçonha de *B. pauloensis* foram resolvidas em 6 picos cromatográficos como mostrado **fig.12A**. Essas frações foram nomeadas CM1, CM2, CM3, CM4, CM5A e CM5B e analisadas PAGE-SDS 12,5% em condições redutoras (**fig.12B**). A fração CM3, posteriormente, foi fracionada em gel filtração Sephacryl-300 com tampão AMBIC 0,05M pH 7,8 fluxo de 0,1mL/min, resultando em dois picos de absorbância a 280nm, onde o pico principal continha metaloprotease BpMP-I (**fig.12C**). Posteriormente, a homogeneidade da BpMP-I foi analisada em cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (dado não apresentado) e em PAGE-SDS 12,5% (**fig.12D**).

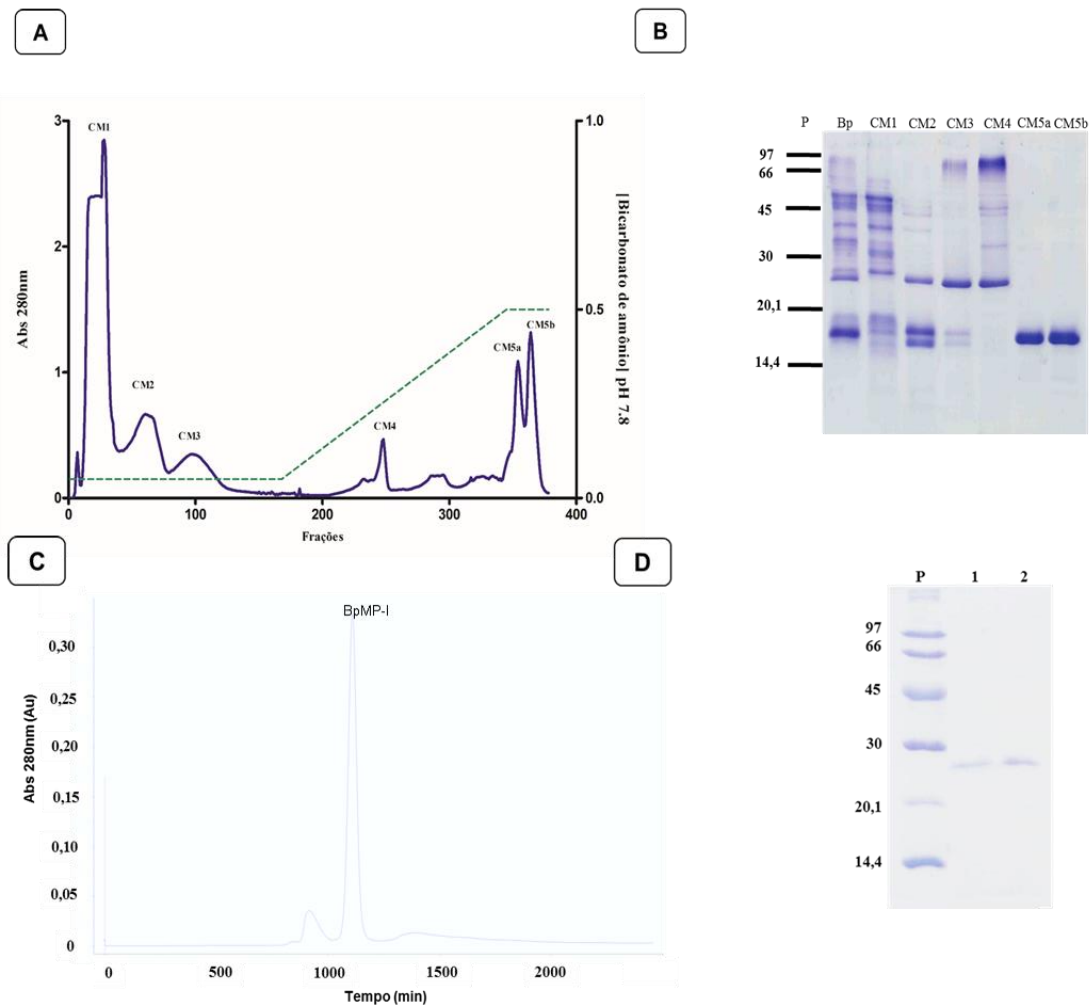


Figura 12: Etapas da purificação da metaloprotease BpMP-I A) Cromatografia da peçonha bruta de *B. pauloensis* (200mg) na coluna de CM- Sepharose equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,8. O gradiente convexo foi aplicado utilizando tampão bicarbonato 0,5M pH 7,8. Frações de 1mL/tubo foram coletadas utilizando um fluxo de 6,5mL/h B) Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12,5%) da peçonha de *B. pauloensis* e frações obtidas na cromatografia de troca iônica (CM1 a CM5b), P é o marcador de massa molecular. C) Fração CM3 (8 mg) recromatografada em Sephacryl S-300 previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,8 com um fluxo de 12mL/h, usando o aparelho AKTA prime plus (Amersham Biosciences). (D) Perfil eletroforético PAGE-SDS (12,5%) da BpMP-I purificada em condição redutora. P: Marcador de Massa Molecular; 1: BpMP-I – 2,5µg; 2: BpMP-I – 5µg.

4.2 Produção e purificação de anticorpos policlonais anti-BpMP-I

4.2.1 Titulação e isolamento dos anticorpos IgG anti-BpMP-I

A primeira dose de imunógeno contendo 35ug da toxina BpMP-I foi aplicada nos camundongos e após 1 semana da exposição dos animais ao antígeno uma amostra de sangue foi retirada via submandibular e o soro utilizado

para titulação dos anticorpos. Durante o período de imunização a titulação do soro ocorreu repetidamente em intervalos de 15 dias.

A titulação do soro dos camundongos coletados foi realizada contra a toxina BpMP-I, e a reação se mostrou positiva a partir do vigésimo primeiro dia como apresentado na **fig.13A**. O soro do quadragésimo nono dia foi testado até diluição 1:12800 (**fig.13B**), apresenta IE>1,2 para todas as diluições testadas. Após quadragésimo nono dia os animais foram sangrados para a obtenção do soro total como descrito no item 3.7.

O soro total foi aplicado em cromatografia de afinidade proteína G HiTrap para a obtenção da amostra de interesse, a imunoglobulina G, foi eluída da coluna no segundo pico (**fig.14A**) e em seguida, sua homogeneidade foi verificada em PAGE-SDS 12,5% (**fig.14B**).

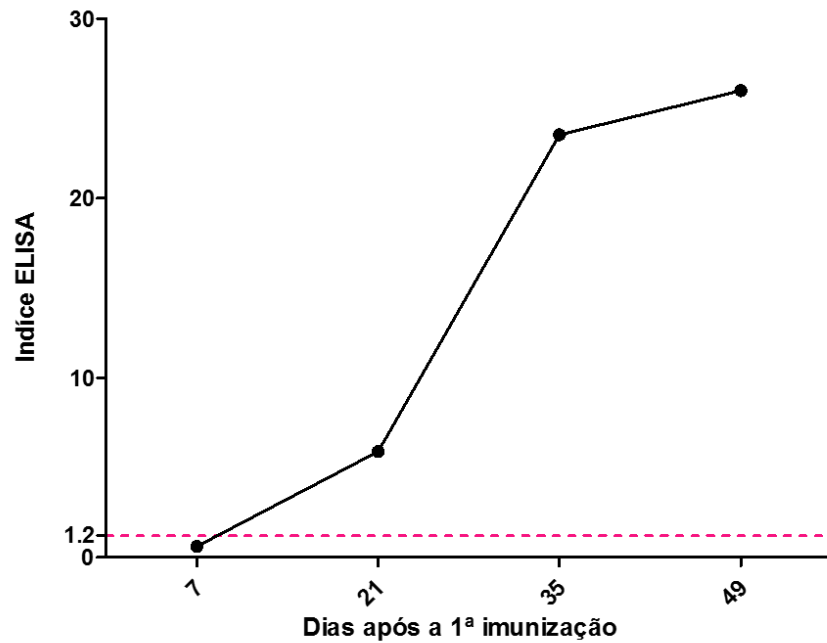
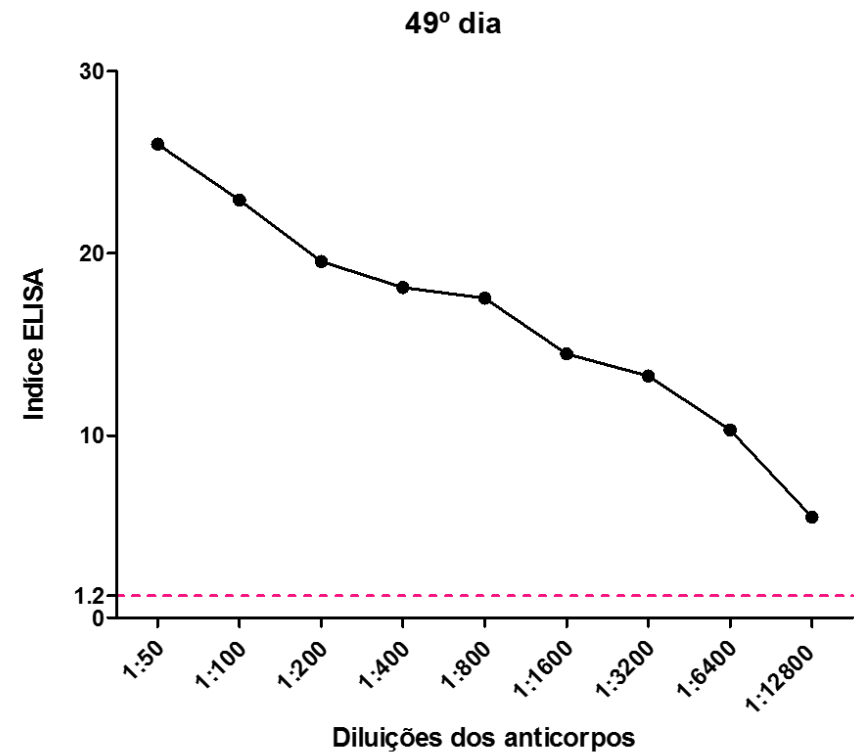
A**B**

Figura 13: Anticorpos IgG Anti-BpMP-I: **A)** Cinética da produção de anticorpos em camundongos Balb/c, após a segunda imunização o IE já se apresenta maior que 1,2. **B)** Titulação do soro proveniente do 49º dia pós a imunização primária.

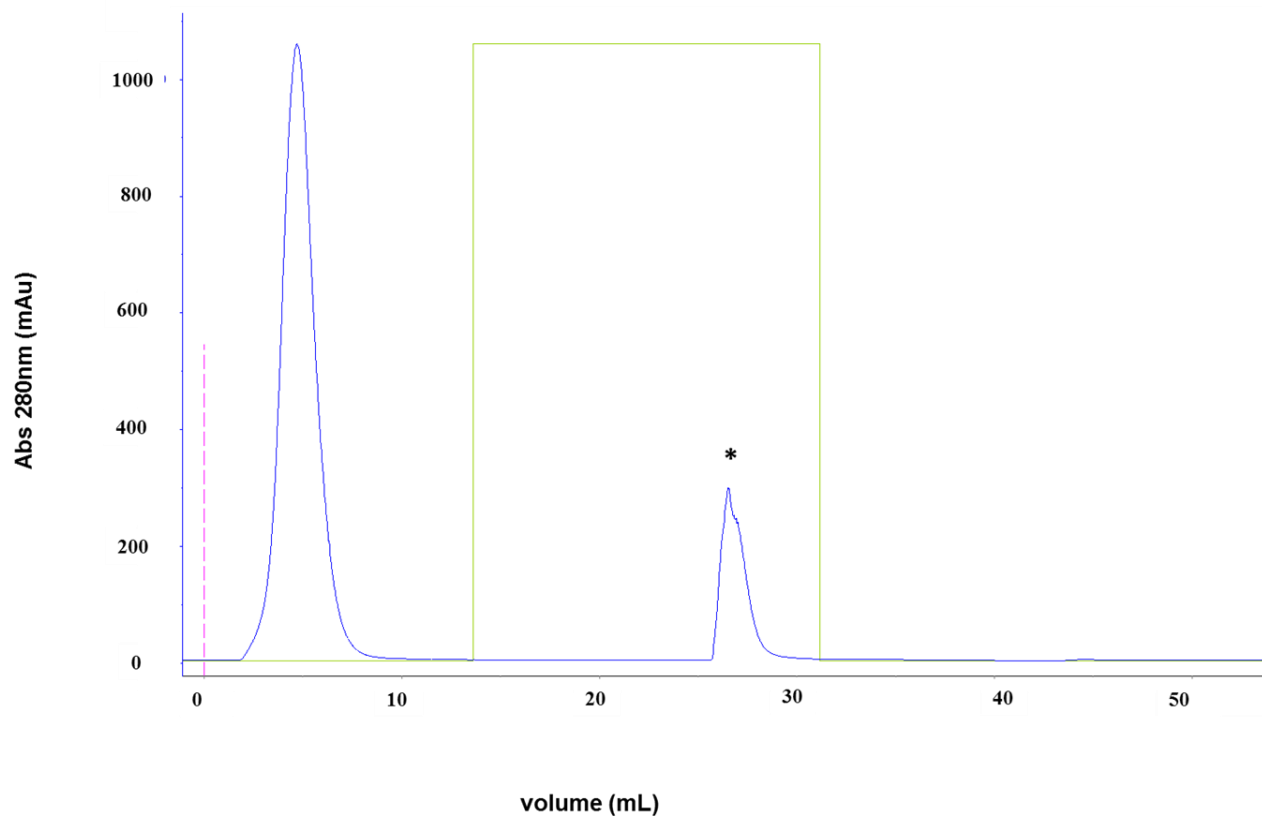
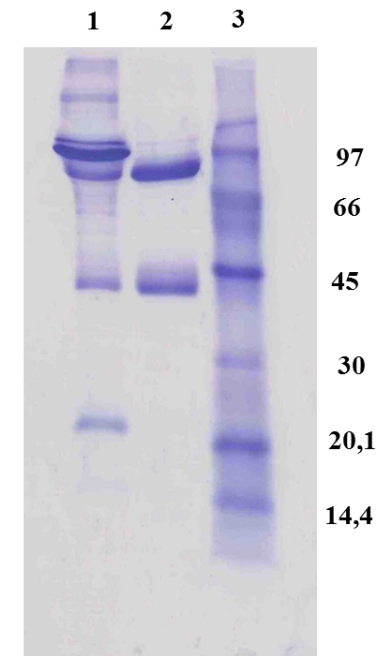
A**B**

Figura 14: Anticorpos IgG anti-BpMP-I: **A)** Cromatografia de afinidade em proteína G Hitrap para obtenção da IgG anti-BpMP-I. (*) fração contendo as IgGs, **B)** Perfil eletroforético 12,5% (PAGE-SDS) em condições redutoras do soro total (1), da fração obtida da cromatografia de afinidade proteína G Hitrap (2) e do marcador de massa molecular (3).

4.2.2 Titulação e isolamento dos anticorpos IgY

As galinhas foram estimuladas na primeira inoculação com o adjuvante de Freud's completo com a toxina (0,25mg), e em seguida com o adjuvante de Freud's incompleto. As amostras de sangue foram retiradas no sétimo dia após a primeira inoculação para a titulação do soro. Durante o processo imunização, a titulação do soro ocorreu repetidamente em intervalos de 15 dias. Simultaneamente, eram feitas coletas diárias dos ovos uma semana antes da primeira inoculação da toxina e diariamente após a indução da produção de anticorpos. As gemas foram agrupadas semanalmente e o extrato proteico obtido segundo a metodologia descrita no item 3.8 (**fig.11**).

O soro total e o extrato proteico da gema foram titulados contra a BpMP-I, e verificou-se que a após o vigésimo primeiro dia da inoculação do antígeno o soro já estava hiperimune e somente a partir do trigésimo quinto dia o IE foi maior que 1,2 para IgY presentes nas gemas coletadas (**fig.15A**). Os soros das galinhas apresentaram altos IE e reconheceram a BpMP-I até a diluição 1:6400 (IE= 8,7), já o extrato das gemas do trigésimo quinto dia foi capaz de reconhecer a metaloprotease somente até a diluição 1:100 (IE=1,9) (**fig.15B**), enquanto que os do sexagésimo terceiro dia foram positivo, IE= 1,86, até a diluição 1:1600 (**fig.15D**). As galinhas foram estimuladas até o septuagésimo dia após a primeira inoculação, IE= 20,0 (**fig.15C**), e os ovos coletados. O extrato proteico preparado com tampão de ligação e submetido em cromatografia de afinidade tiofílica usando a coluna IgY HiTrap HP. As frações ricas em IgY foram eluídas com tampão fosfato de sódio 0,02M pH 7,5 (**fig.16A**) e analisadas em PAGE-SDS 12,5% (**fig.16B**).

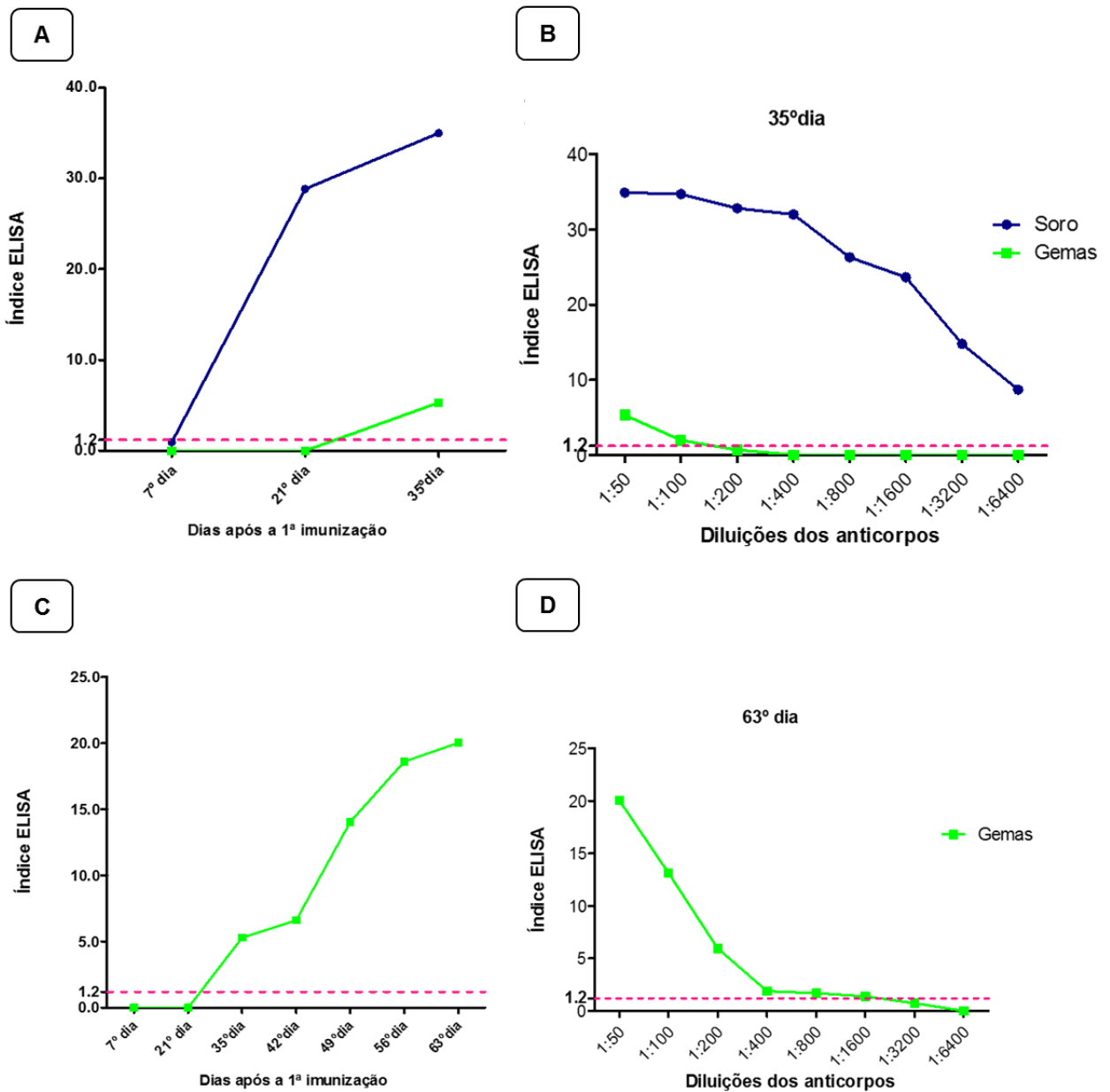


Figura 15: Anticorpos IgY Anti-BpMP-I: **A)** Cinética da produção de anticorpos nas galinhas da raça White leghorn, em azul o IE apresentado pelo soro total dos animais e em verde o apresentado pelas gemas dos ovos. **B)** Titulação do soro e das gemas provenientes do 35º dia pós a imunização primária. **C)** Cinética da produção de anticorpos apenas das gemas até a 9ª semana. **D)** Titulação das gemas provenientes do 63º dia após a imunização primária.

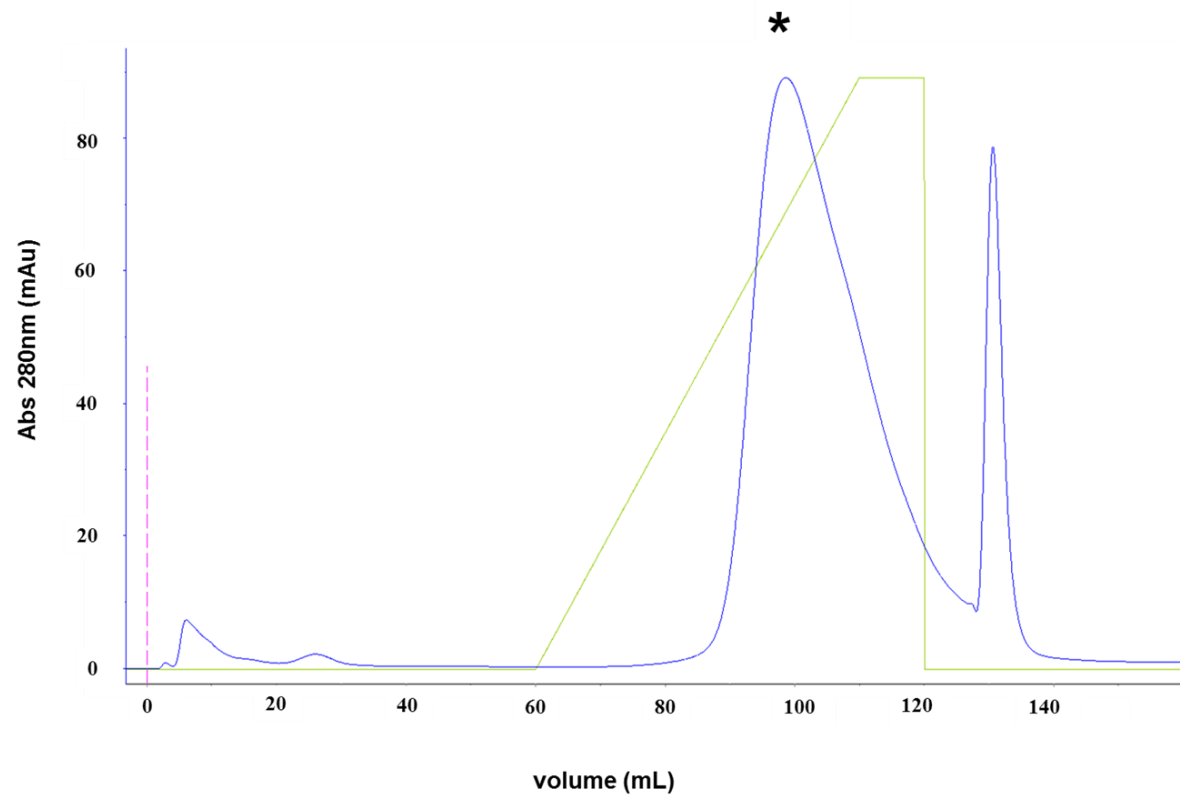
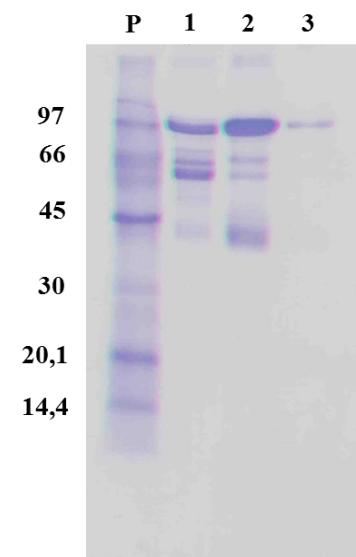
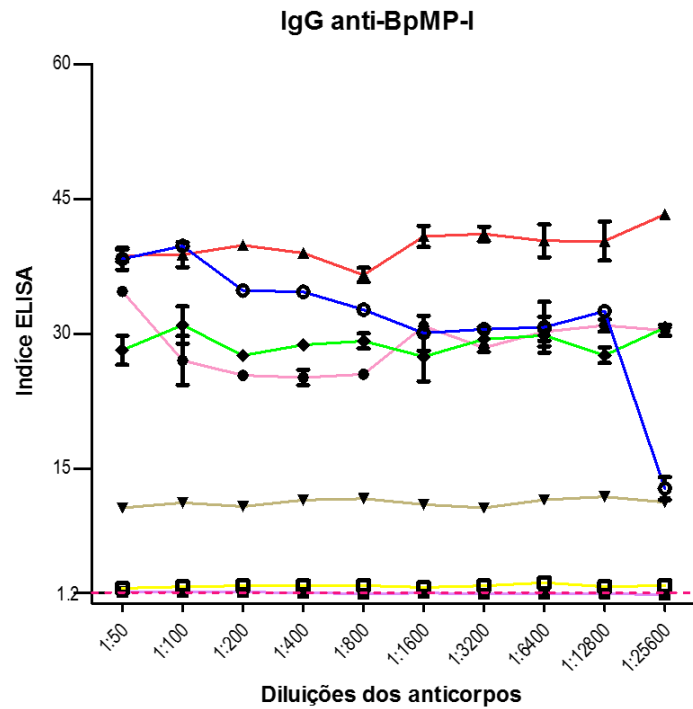
A**B**

Figura 16: Anticorpos IgY anti-BpMP-I: **A)** Cromatografia de afinidade em HiTrap IgY Purification HP para obtenção da IgY anti-BpMP-I. (*) fração contendo as IgYs, **B)** Perfil eletroforético 12,5% (PAGE-SDS) em condições redutoras do extrato total da gema (1), do extrato da gema após precipitação por sulfato de amônio (2), IgY purificada após cromatografia (3) e o marcador de massa molécul em kDa (P).

4.3 Ensaios de reatividade cruzada dos anticorpos anti-BpMP-I pelo método ELISA

Após o isolamento das imunoglobulinas, IgG e IgY, as mesmas foram utilizadas para verificar sua capacidade de reconhecimento contra toxinas isoladas, BpMP-I e BnSP-7, e também peçonhas brutas das espécies *B. pauloensis*, *B. jararaca*, *B. atrox*, *B. diporus* e *C. durissus colillineatus* (**fig.17**). Os anticorpos IgG e IgY apresentaram altos índices de reconhecimento para a BpMP-I nas diferentes diluições (**fig.17A** e **fig.17B**), mas as IgYs obtiveram índices de reconhecimento maiores do que as IgGs. Ambas as imunoglobulinas reconheceram diferentes peçonhas botrópicas, no entanto, as IgGs apresentaram maior reconhecimento para espécies de *B. pauloensis*, *B. jararaca* e *B. diporus* (**fig.17A**). Os anticorpos IgY apresentaram altos IEs para a peçonha de *B. diporus*. E nenhum dos anticorpos conseguiram reconhecer significativamente a fosfolipase A₂ BnSP-7 ou a peçonha da *C. durissus colillineatus*.

A



B

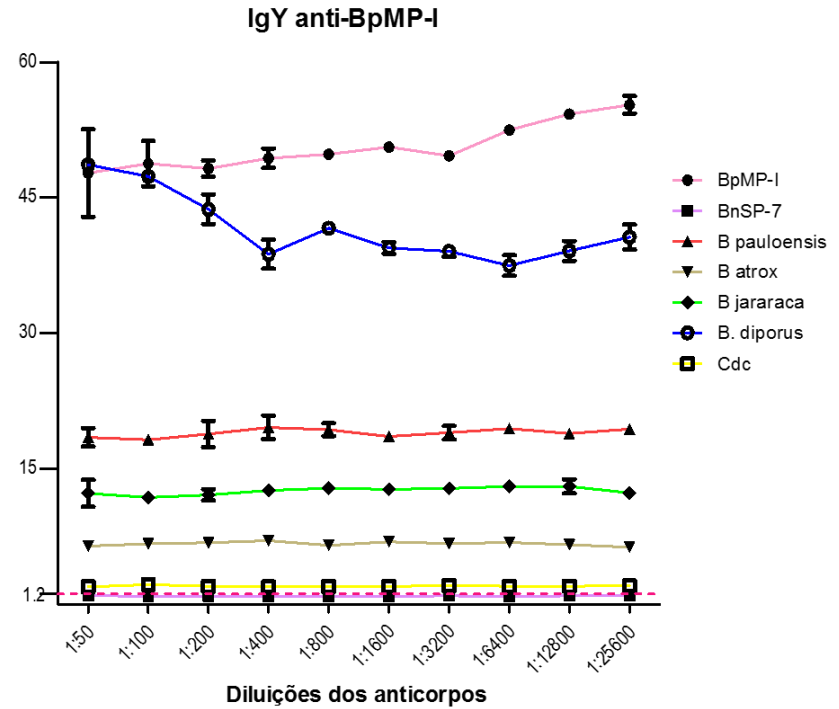


Figura 17: Reatividade cruzada das IgG anti-BpMP-I (A) e das IgY anti-BpMP-I (B) pelo método ELISA contra BpMP-I (metaloprotease), BnSP-7 (fosfolipase A₂) e diferentes peçonhas brutas. Resultados são apresentados com média e desvio padrão.

4.4 Análise de reconhecimento dos anticorpos para diferentes peçonhas por western blotting

As peçonhas foram submetidas a eletroforese PAGE-SDS 12,5% em condições redutoras e não redutoras, e posteriormente transferidas para membranas de nitroceluloses. Após os procedimentos realizados conforme o item 3.5, observou que os anticorpos foram capazes de reconhecer diferentes proteínas presentes nas peçonhas (**fig.18 e fig.19**). Nas condições redutoras, os anticorpos reconheceram fortemente proteínas entre 17 e 30 kDa (**fig.18**). E observamos ainda que em condições não redutoras, a capacidade de reconhecimento foi singular (**fig.19**), ambas imunoglobulinas reconheceram moléculas localizadas entre 52 e 150 kDa. É notável a diferença entre perfis de reconhecimento das imunoglobulinas verificadas nas análises de intensidade das bandas (**fig.20 e fig.21**). Ao realizar o alinhamento da BpMP-I com diferentes metaloproteases já isoladas (**tabela 2**) verificou-se que ela apresentava alta similaridade com proteínas presentes nessas peçonhas testadas.

Tabela 2 Toxinas derivadas de peçonhas botrópicas que apresentam identidade estrutural com a BpMP-I A proporção de aminoácidos idênticos é mostrada, assim como a classe de cada enzima.

TOXINA	ALINHAMENTO (IDENTIDADE)	MASSA MOLECULAR (kDa)	CLASSE	SERPENTE
BOTROPOIDINA	-----	49.5	SVMP-III	<i>B. pauloensis</i>
BpMP-II	56%	23	SVMP-I	<i>B. pauloensis</i>
ATROXLISINA	49%	23	SVMP-I	<i>B. atrox</i>
BATX-I	92%	23,3	SVMP-I	<i>B. atrox</i>
HF3	51%	70	SVMP-III	<i>B. jararaca</i>
BOTROPASINA	47%	50	SVMP-III	<i>B. jararaca</i>
JARARAGINA	45%	52	SVMP-III	<i>B. jararaca</i>
BOTROJARACTIVASE	60%	22,8	SVMP-I	<i>B. jararaca</i>

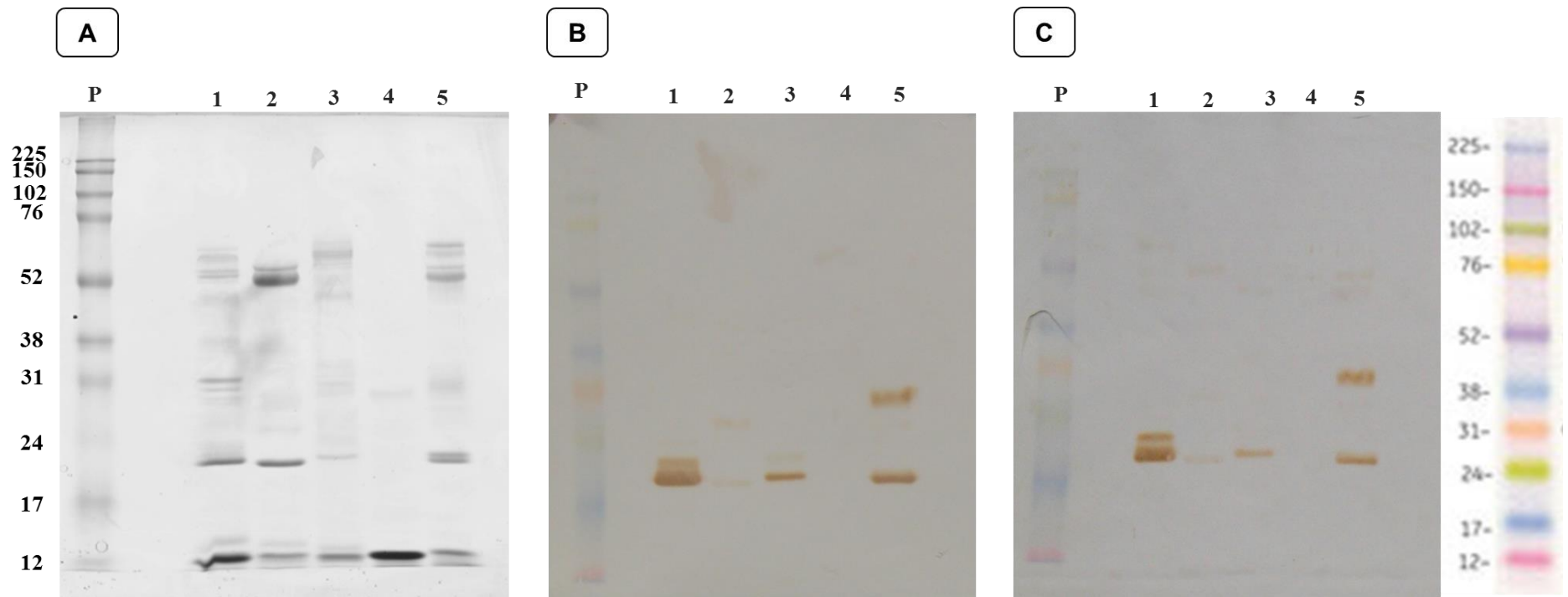


Figura 18: Perfil de reconhecimento de proteínas **REDUZIDAS** de diferentes peçonhas por anticorpos policlonais IgG anti-BpMP-I e IgY anti-BpMP-I em western blotting: **(A)** PAGE-SDS (12,5%) em condições redutoras, **(B)** Proteínas reconhecidas por IgG e **(C)** Proteínas reconhecidas por IgYs. **P:** marcador de massa molecular (Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers); diferentes peçonhas: **1.** *B. pauloensis*; **2.** *B. atrox*; **3.** *B. jararaca*; **4.** *C. durissus collilineatus*; **5.** *B. diporus*.

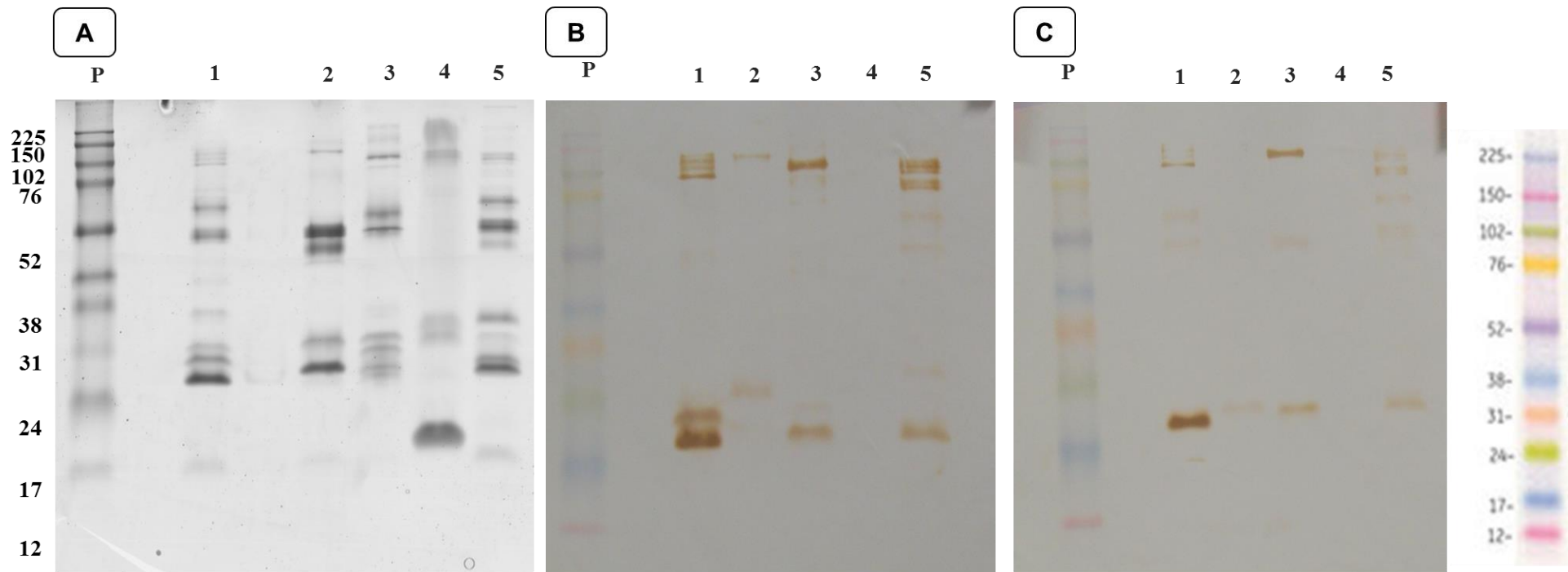


Figura 19: Perfil de reconhecimento de proteínas **NÃO REDUZIDAS** de diferentes peçonhas por anticorpos policlonais IgG anti-BpMP-I e IgY anti-BpMP-I em western blotting: **(A)** PAGE-SDS (12,5%) em condições não redutoras, **(B)** Proteínas reconhecidas por IgG e **(C)** Proteínas reconhecidas por IgYs. **P:** marcador de massa molecular (Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers); diferentes peçonhas: **1.** *B. pauloensis*; **2.** *B. atrox*; **3.** *B. jararaca*; **4.** *C. durissus collilineatus*; **5.** *B. diporus*.

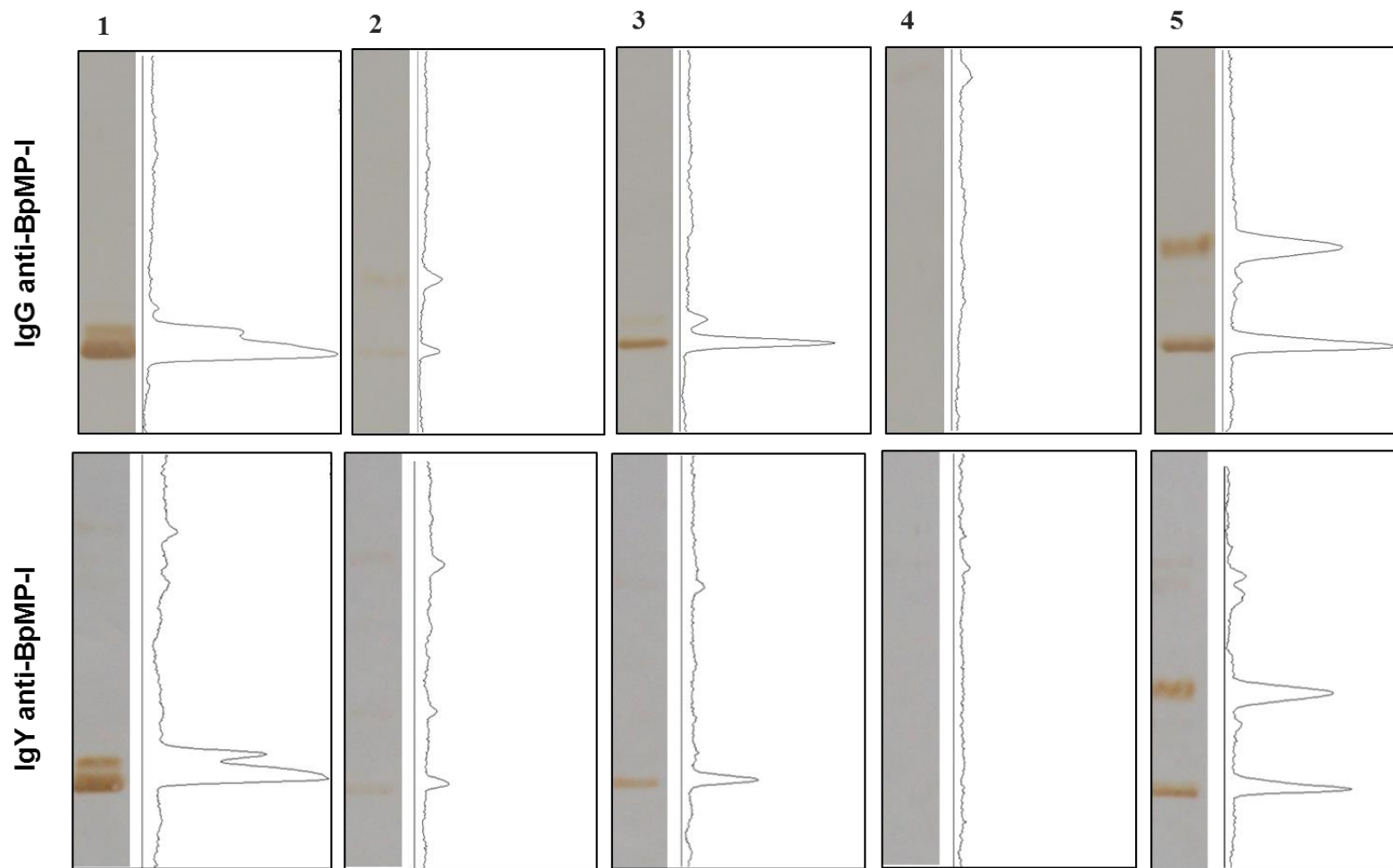


Figura 20: Análise da intensidade de reação no Westen blotting das **amostras reduzidas**. Diferentes peçonhas: **1.** *B. pauloensis*; **2.** *B. atrox*; **3.** *B. jararaca*; **4.** *C. durissus collilineatus*; **5.** *B. diporus*.

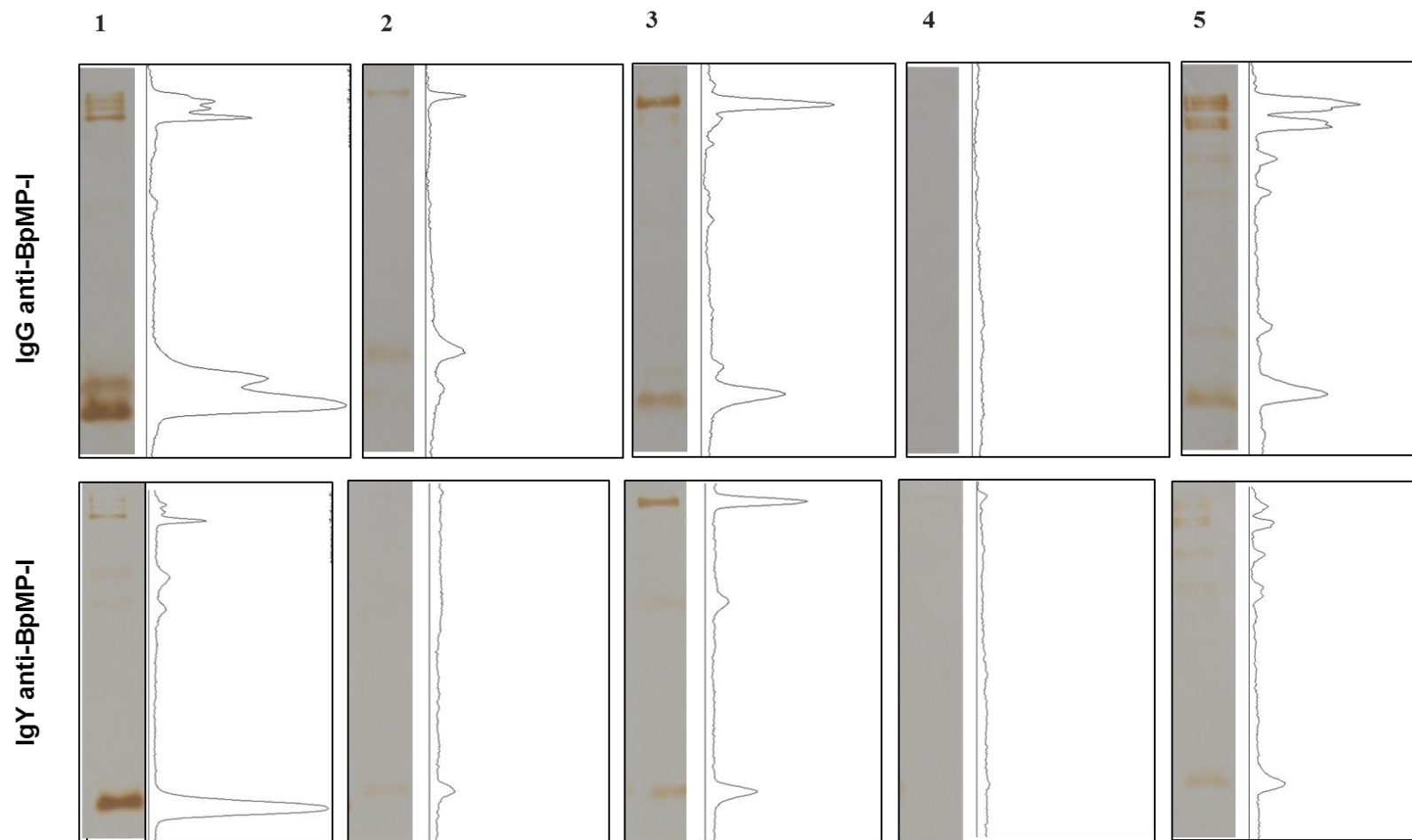


Figura 21: Análise da intensidade de reação no Westen blotting das **amostras não reduzidas**. Diferentes peçonhas: **1.** *B. pauloensis*; **2.** *B.atrox*; **3.** *B.jararaca*; **4.** *C. durissus collilineatus*; **5.** *B.diporus*

4.5 Validação do potencial neutralizador dos anticorpos policlonais (IgG e IgY) anti-BpMP-I

4.5.1 Neutralização da atividade azocaseinolítica da BpMP-I

A BpMP-I é uma protease capaz de clivar diferentes substratos, dentre eles a azocaseína como descrito por Naves de Souza e colaboradores, 2012. Os anticorpos policlonais (IgG e IgY) anti-BpMP-I foram capazes de neutralizar significativamente a atividade proteolítica da BpMP-I (**fig.22**) quando pré-incubados com a toxina a 37°C por 1 hora nas razões 1:2,5 e 1:5 (protease:anticorpo; $\mu\text{M}/\mu\text{M}$). Os anticorpos IgG anti-BpMP-I a uma razão 1:5 (protease:anticorpo; $\mu\text{M}/\mu\text{M}$) foram mais eficientes na neutralização da atividade proteolítica da BpMP-I, sendo capazes de inibir 80% da atividade proteolítica da BpMP-I.

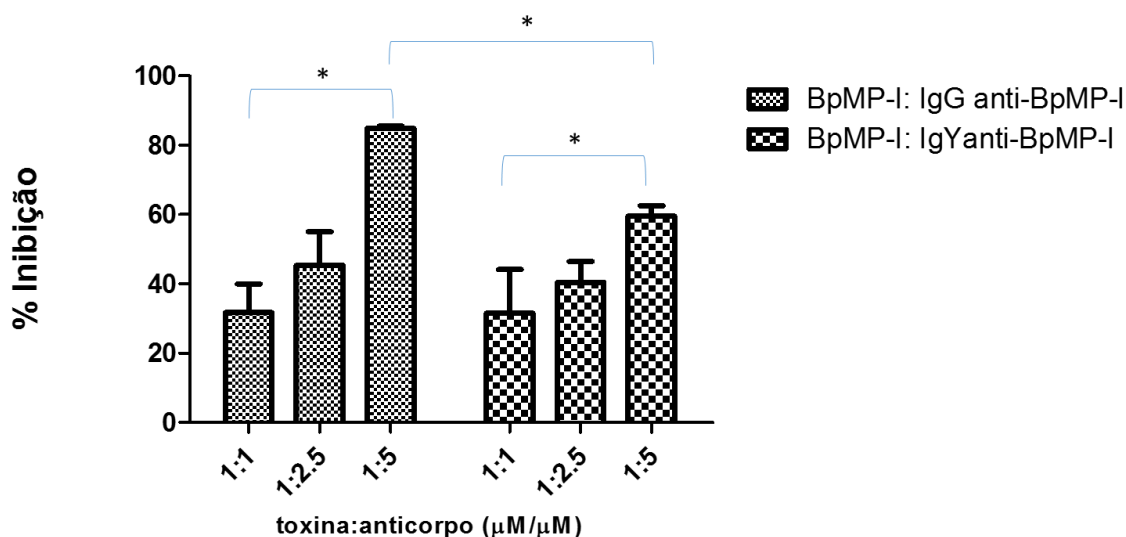


Figura 22: Determinação da atividade neutralizante dos anticorpos sobre a atividade proteolítica da BpMP-I em azocaseína A BpMP-I ($1,086\mu\text{M}$) foi previamente incubada com os anticorpos anti-BpMP-I em diferentes proporções toxina: anticorpos, por 1h a 37°C. Resultados são apresentados com média e desvio padrão. (*) significância $p < 0,05$

4.5.2 Neutralização da atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops pauloensis*

Os anticorpos policlonais anti-BpMP-I (IgG e IgY) quando pre-incubados com a peçonha de *B. pauloensis* em diferentes razões (PB:anticorpos, m/m) por 30

minutos a 37°C, foram capazes de neutralizar significativamente a atividade hemorrágica induzida por essa peçonha (**fig.23**). Na proporção 1:50 (peçonha bruta: anticorpos, m/m) a hemorragia induzida no dorso de camundongos foi completamente neutralizada (**fig.24**).

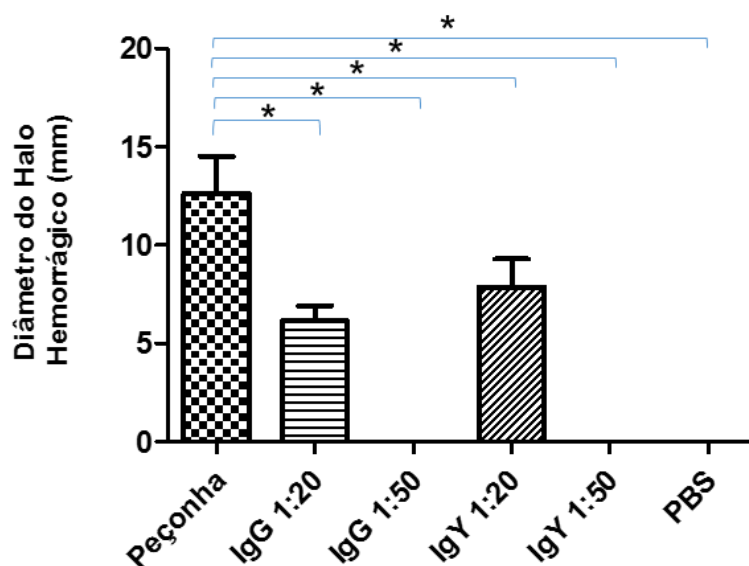


Figura 23: Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. pauloensis* por anticorpos anti-BpMP-I IgG e IgY. Proporções toxina: anticorpo (m/m). (*) significância $p < 0,05$.

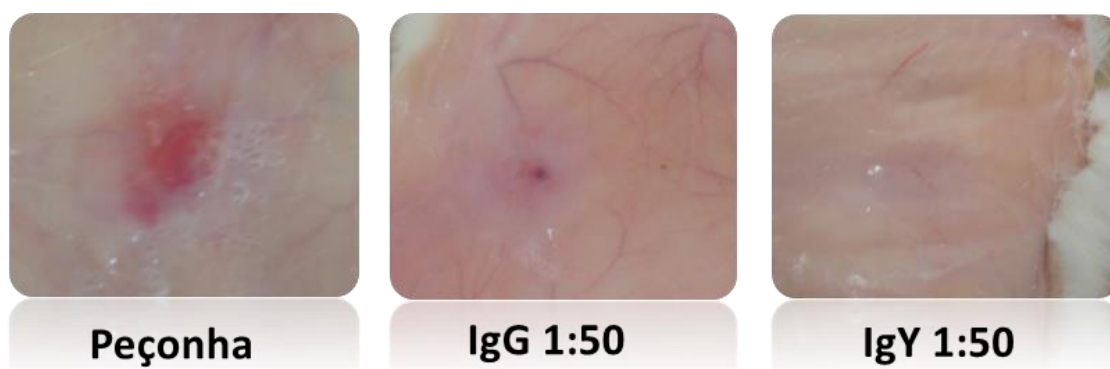


Figura 24 Atividade hemorrágica. (A) Controle positivo – 5 µg de peçonha de *B. pauloensis*. (B) IgG anti-BpMP-I – 1:50 (toxina: anticorpo). (C) IgY anti-BpMP-I – 1:50 (toxina: anticorpo).

4.6 Cromatografias da peçonha *B. pauloensis* em colunas de afinidade

Cerca de 20mg de peçonha bruta *B. pauloensis* foram aplicadas nas colunas de afinidade acopladas os anticorpos anti-BpMP-I (IgY- e IgG- Sepharose, previamente preparadas de acordo com o item 3.12. As frações não-ligantes

(P1IgG, P1IgY) e ligantes (P2IgG, P2IgY) (**fig.25A e fig.25B**) foram agrupadas e visualizadas em PAGE-SDS 12,5% de acordo item 3.5 (**fig.25C**). O rendimento proteico compreendeu cerca de 8 a 10% do total de proteínas presentes na peçonha bruta, como podemos verificar na **tabela 3**. As frações ligantes (P2IgG, P2IgY) apresentaram heterogêneas compreendendo massas moleculares entre os padrões 14 kDa e 66 kDa.

Tabela 3: Rendimento proteico das cromatografias de afinidade da peçonha *B. pauloensis*.

Resina	Etapas de Purificação	mg (totais)*	Recuperação (%)
IgG-Sepharose	Peçonha Bruta	13,575	100
	P2IgG	1,153	8,5
IgY-Sepharose	Peçonha Bruta	10,38	100
	P2IgY	1,090	10,5

* Dosagem realizada pelo método de Bradford (1974).

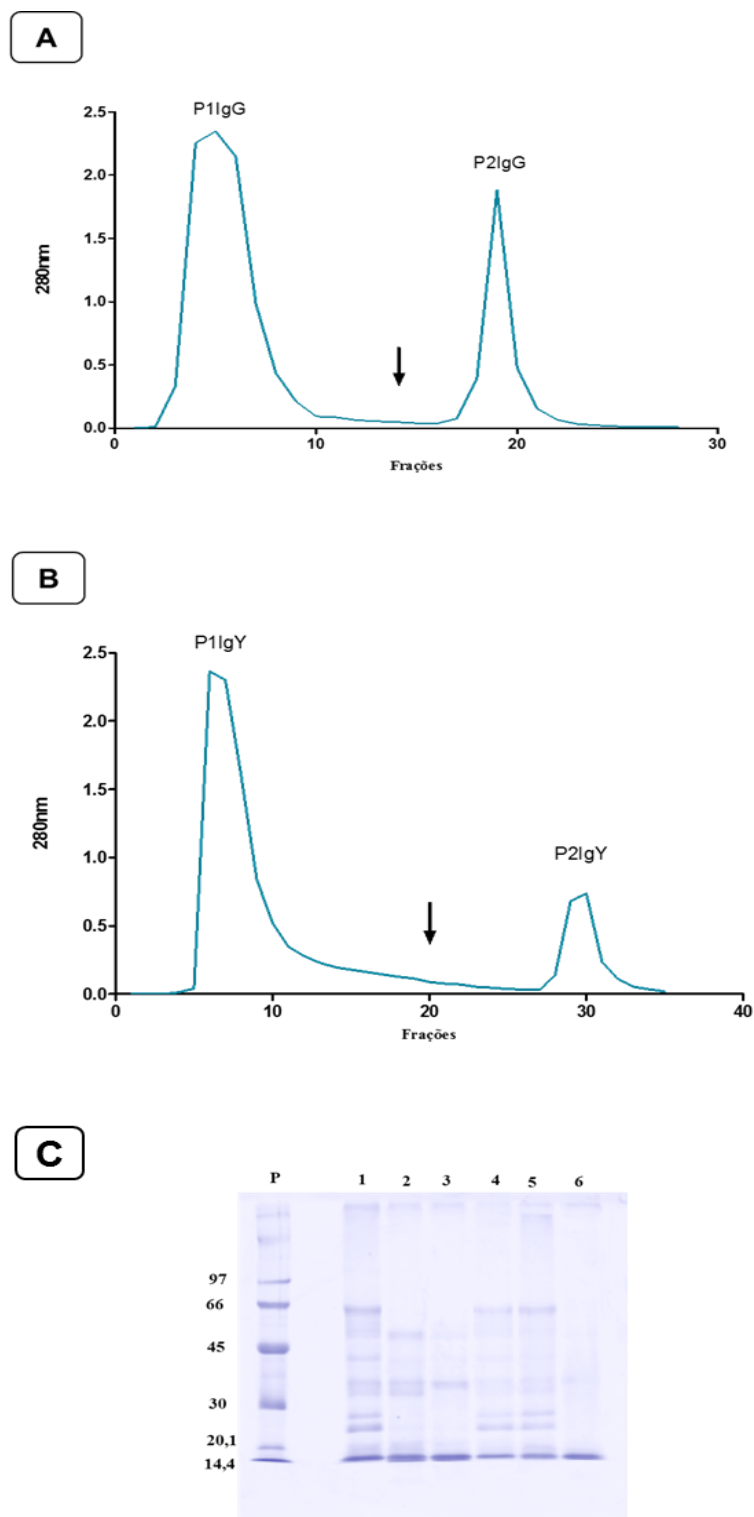


Figura 25: Peçonha de *B. pauloensis* em colunas de afinidade. **(A)** Perfil cromatográfico em resina IgG sepharose. **(B)** Perfil cromatográfico em resina IgY-sepharose. **(C)** Perfil eletroforético em condições redutoras da peçonha *B. pauloensis* (1) e das frações P1IgG (2), P2IgG (3), P1IgY (4) e P2IgY (6), provenientes das cromatografias de afinidade. ↓ Troca de tampão.

4.7 Análise em géis bidimensionais das frações ligadas dos anticorpos policlonais anti-BpMP-I

As frações ligantes de cada cromatografia de afinidade (IgY-Sepharose e IgG-Sepharose) foram visualizadas em géis bidimensionais. Os géis bidimensionais foram processados de acordo com item 3.14 (**fig.26 e fig.27**). Os spots nos géis concentram no intervalo de pI entre 3 e 7, com massas entre 14,4kDa e 45 kDa. As combinações ou “match” resultaram em 20 proteínas ligantes da fração P2IgY e 23 proteínas ligantes de P2IgG (**fig.28**).

4.8 Identificação das proteínas

Os “spots” proteicos que eram expressivos e apresentaram “match” entre as triplicatas foram selecionados, extraídos dos géis (**fig.28**) processados de acordo com a metodologia (itens 3.17 e 3.18) para a análise por espectrometria de massas usando a técnica e MALDI/TOFTOF. Os espectros de massas resultantes (MS e MS/MS) foram utilizados na identificação das proteínas, por meio de busca no banco de dados do NCBI pelo software MASCOT® e pelo Biotools. A interpretação dos espectros de massas combinados permitiu a identificação 11 proteínas ligantes a IgG sepharose com massa e/ou pI diferenciados, assim como 11 proteínas identificadas para a fração ligante da IgY sepharose (**tabela 5**). Dessas proteínas oito foram encontradas em ambas frações (**tabela 6**).

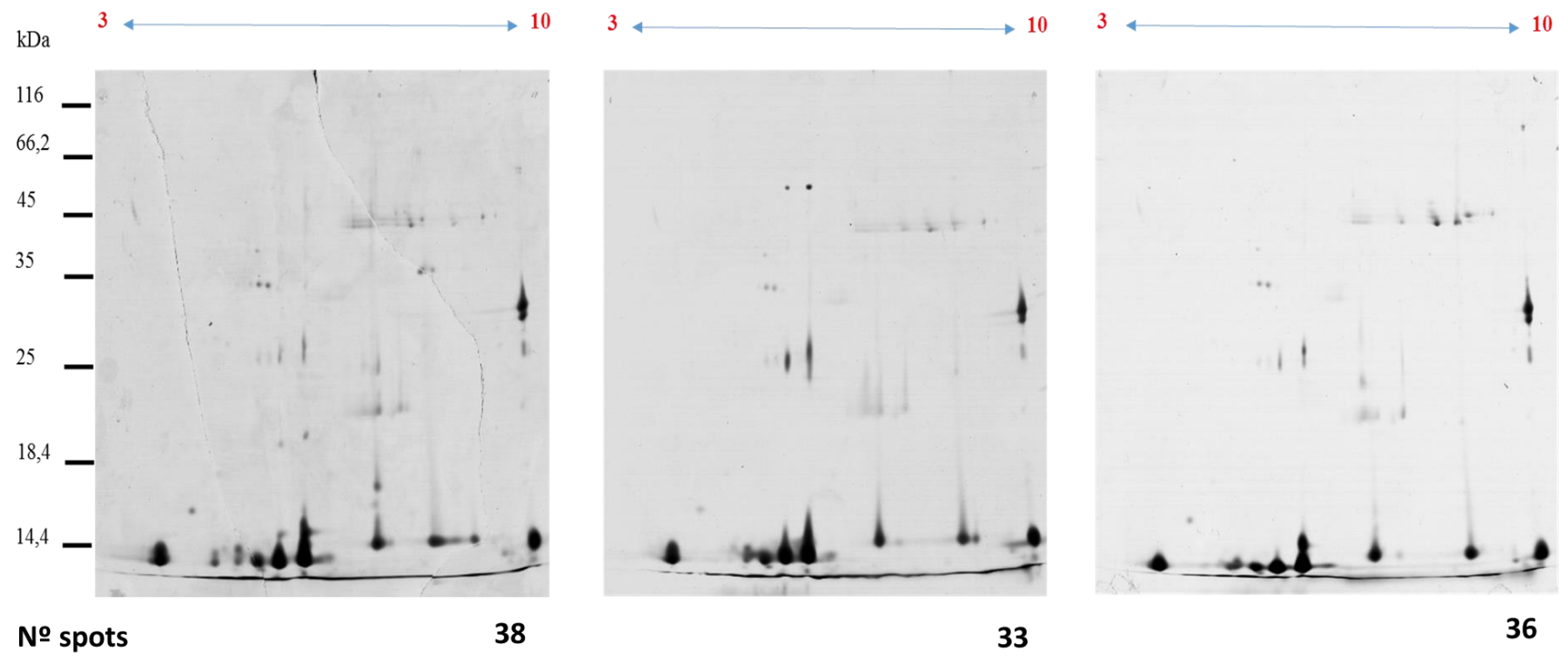


Figura 26: Triplicata dos géis bidimensionais da fração P2IgG (ligantes da IgG sepharose).

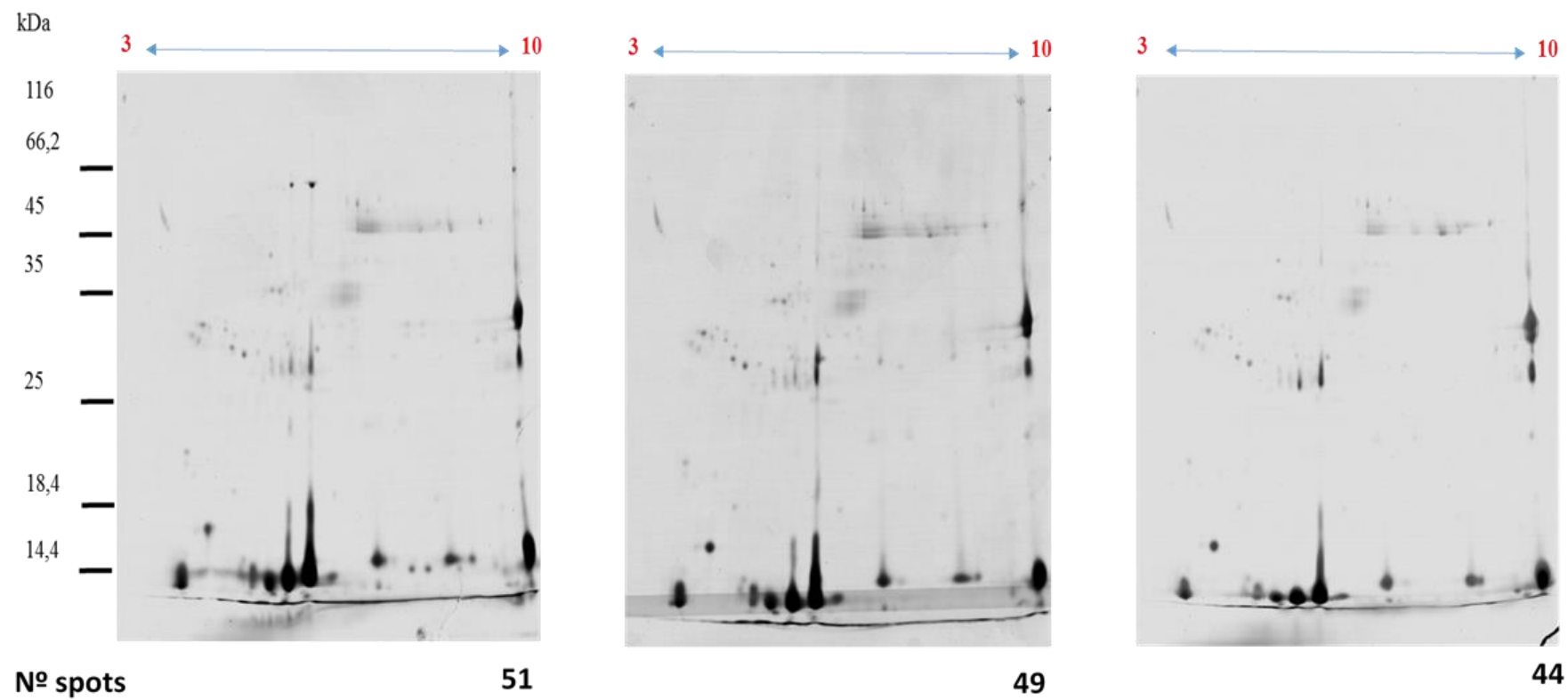


Figura 27: Triplicata dos géis bidimensionais da fração P2IgY (ligante da IgY sepharose).

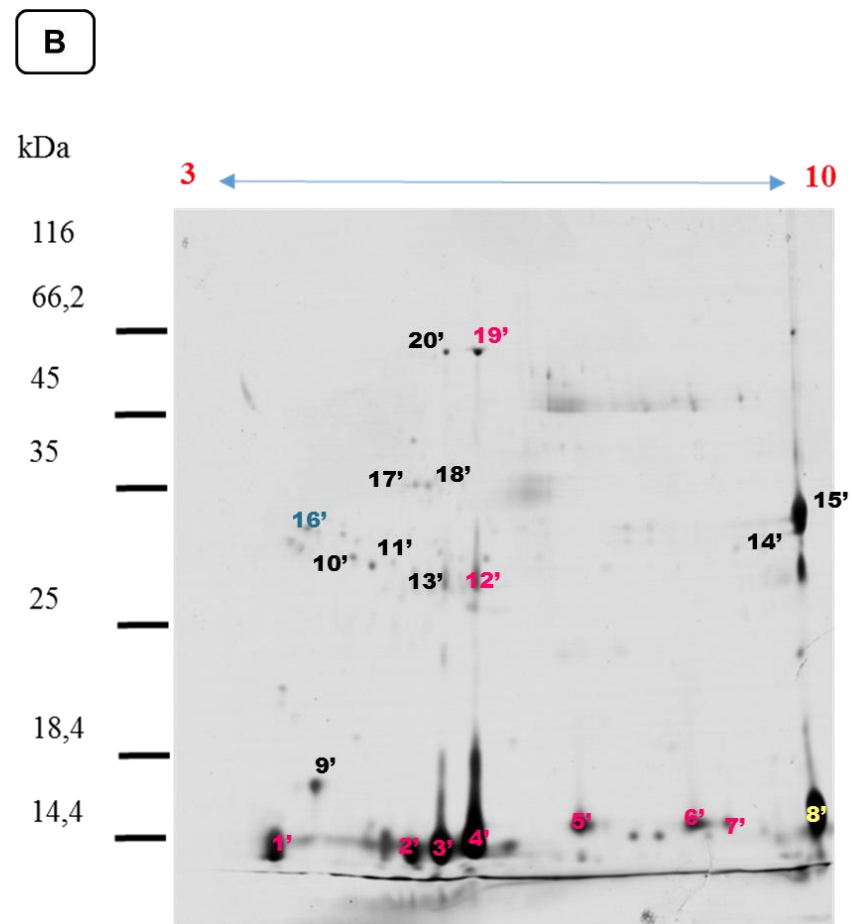
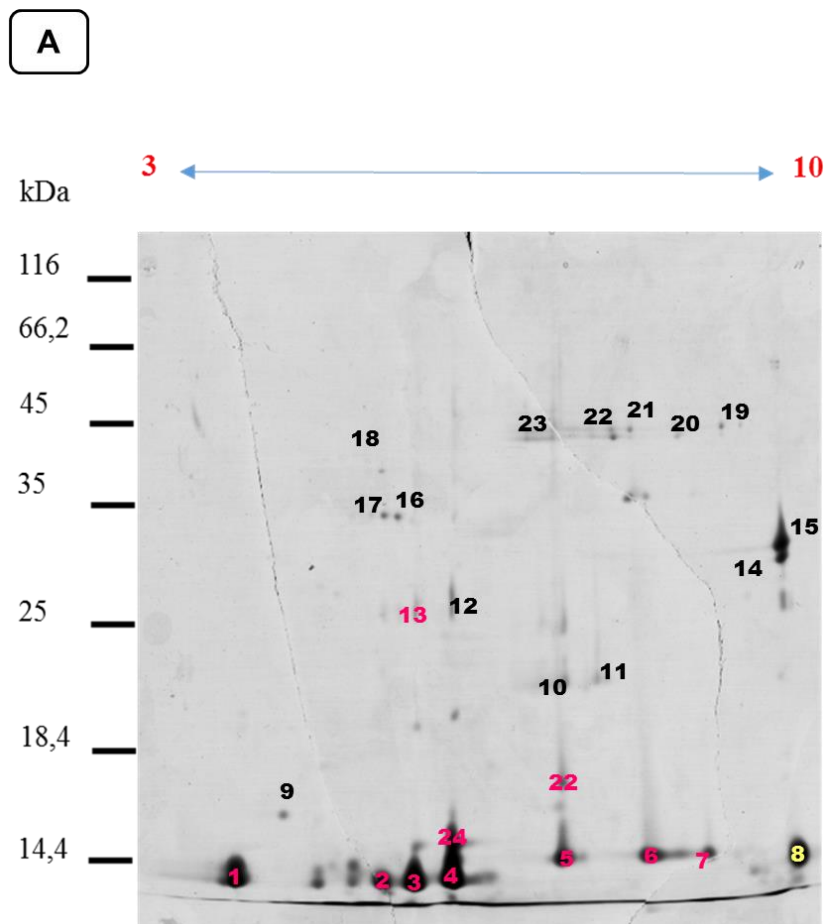


Figura 28 Géis bidimensionais das frações ligantes P2IgG (A) e P2IgY (B), e os 'spots' identificados. Numeração em rosa – lectinas ou semelhantes a lectinas; amarelo – fosfolipase A₂; azul – metaloprotease.

Tabela 4 Identificação dos spots das frações ligadas a IgG-Sepharose e IgY-Sepharose.

FRAÇÃO	SPOT	ÍON m/z	PEPTIDEO	IDENTIFICAÇÃO	CLASSE DE PROTEÍNAS	ID ACESSO	BANCO DE DADOS
P2IgG	1	1131,670		Subunidade β da botrocetina	Lectina- <i>like</i>	SLEB_BOTJA	SwissProt
		1289,698	FKNFVCEFQA				
		1701,900	EGFVSSNTSEFI				
		1928,100	DCPPDWSSYEGHCYR				
	2	764,622	IFDEIK	BpLec	Lectina-tipo C	LECG_BOTPA	SwissProt
		944,593					
		1241,794	DFSWEWTDR				
		1473,012	YKPGCHLASFHR				
		1623,070	EFCVEIVSYTGYR				
		1865,247	(KN)EFCVEIVSYTGYR				
	3	764,580	IFDEIK	BpLec	Lectina-tipo C	LECG_BOTPA	SwissProt
		944,550					
		1241,739	DFSWEWTDR				
		1623,014					
		1865,179	NKEFCVEIVSYTGYR				
		1901,163	(GY)ESPEIAEYISDYHK				
4	1242,000	DFSWEWTDR	BpLec	Lectina-tipo C		BLAST ncbi	
	1623,000	EFCVEIVSYTGYR					

	1865,000	NKEFCVEIVSYTGYR					
5	2288	SEWSDGSSVSYENVVER	Subunidade α da botrocetina	Lectina- <i>like</i>	P22029.2	BLAST ncbi	
6	2228	WSDGSSVSYENVVER	Subunidade α da botrocetina	Lectina- <i>like</i>	P22029.2	BLAST ncbi	
	2287	SEWSDGSSVSYENVVER					
7	2288,000	WSDGSSVSYENVVE	Subunidade α da botrocetina	Lectina- <i>like</i>	P22029.2	BLAST ncbi	
8	1533	SYGAYGCNCGVLGR	PLA ₂ básica	Fosfolipase A ₂	PA2H1_BOTMO	SwissProt	
12	764	IFDEIK	BpLec	Lectina-tipo C	LECG_BOTPA	SwissProt	
22	2288	WSDGSSVSYENVVER	Subunidade α da botrocetina	Lectina- <i>like</i>	P22029.2	BLAST ncbi	
24	1241	DFSWEWTDR	Galatrox	Lectina-tipo C	PODM53.1	BLAST ncbi	

FRAÇÃO	SPOT	ÍON m/z	PEPTIDEO	IDENTIFICAÇÃO		ID ACESSO	BANCO DE DADOS	
P2IgY	1'	1131	WWIIPCT	Subunidade β da	Lectina- <i>like</i>	SLEB_BOTJA	SwissProt	
			1702	DFVSSLTS	botrocetina			
			1929	DWSSYEGHCY				
	2'	764	IFDEIK	BpLec	Lectina-tipo C	LECG_BOTPA	SwissProt	
			1241	DFSWEWTDR				
			1622	EFCVELVSYTGYR				
	3'	1369	KDFSWEWTDR	BpLec	Lectina-tipo C	LECG_BOTPA	SwissProt	
			1622	EFCVEIVSYTGYR				
			1865	NKEFCVEIVSYTGYR				
			1241	DFSWEWTDR				
	4'	1241	DFSWEWTDR	BpLec	Lectina-tipo C	LECG_BOTPA	SwissProt	
			1623	EFCVEIVSYTGYR				
			1865	NKEFCVEIVSYTGYR				
	5'	2288	SEWSDGSSVSYENVVER	Subunidade α da	Lectina- <i>like</i>	P22029.2	BLAST ncbi	
				botrocetina				

6'	2288	WSDGSSVSYENVVER	Subunidade α da botrocetina	Lectina- <i>like</i>	P22029.2	BLAST ncbi
7'	2288	WSDGSSVSYENVVER	Subunidade α da botrocetina	Lectina- <i>like</i>	P22029.2	BLAST ncbi
8'	1533	(YS) GAYGCNCGVIGR	PLA ₂	Fosfolipase A ₂	<u>P0DI92.1</u>	BLAST ncbi
	802	AVAICIR				
12'	1901	YGESPELAEYLSDYHK	BpLec	Lectina-tipo C	<u>P86970.2</u>	BLAST ncbi
	764	IFDEIK				
16'	1109	GDEYFYCR	MP_III3 SVMP	SVMP-PIII	<u>ADO21503.1</u>	BLAST ncbi
19'	1623	EFCVEIVSYTGYR	BJcuL	Lectina-tipo C	<u>P83519.2</u>	BLAST ncbi
	1901	YGESPEIAEYISDYHK				
	764	IFDEIK				

Tabela 5 Proteínas identificadas comumente encontradas nas amostras ligantes da IgG sepharose e da IgY Sepharose.

IgG-Sepharose	IgY-Sepharose	Classe de Proteínas
ID spot	ID spot	
1	1'	Lectinas
2	2'	Lectinas
3	3'	Lectinas
4	4'	Lectinas
5	5'	Lectinas
6	6'	Lectinas
7	7'	Lectinas
8	8'	Fosfolipase A ₂

4.9 Imunolocalização de alvos no secretoma de células tumorais

A desregulação das MMPs está ligada aos processos de desenvolvimento de câncer, como neovascularização tumoral, invasão e metástase (GOMIS-RÜTH, 2010; VANDENBROUCKE; LIBERT, 2014).

O material secreta pelas células tumorais MACL-1 (linhagem primária de câncer de mama) foi observado em PAGE-SDS 12,5% (**fig.29A**) em condições não redutoras em diferentes quantidades 1 μ g, 3 μ g, 5 μ g e 10 μ g. As mesmas condições foram utilizadas para verificar se o secretado apresentava atividade proteolítica, e como podemos visualizar na **fig.29B**, proteínas presentes no secretado apresentou atividade gelatinolítica.

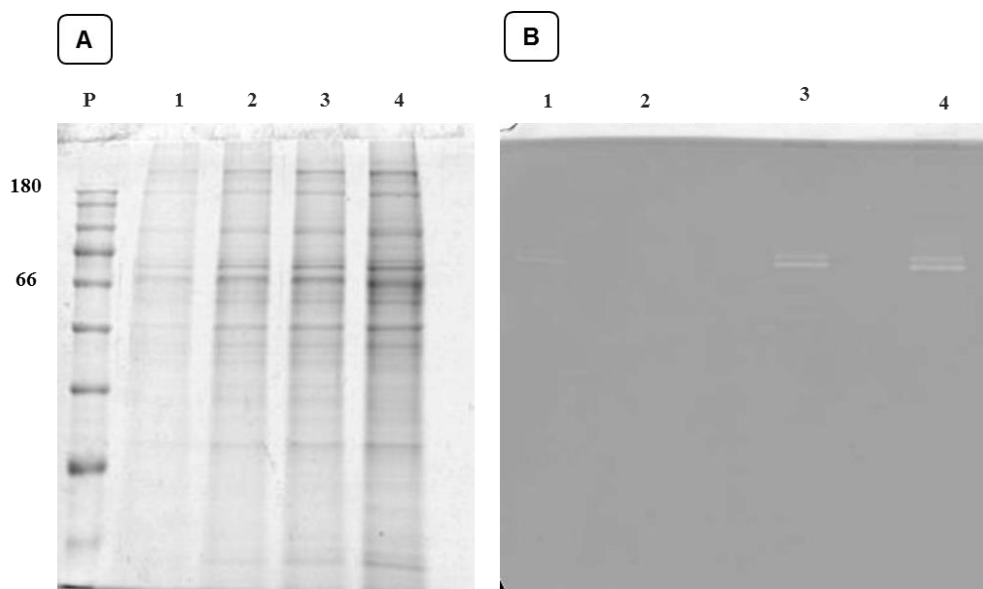


Figura 29: Avaliação do perfil eletroforético das proteínas secretadas pelas células tumorais MACL-1 (**A**) e a avaliação da atividade gelatinolítica (**B**). (P) Padrão de massa molecular e secretoma das células tumorais, 1 μ g (1), 3 μ g (2), 5 μ g (3) e 10 μ g (4).

Em seguida foi avaliado se os anticorpos anti-BpMP- I apresentavam a capacidade de reconhecer proteínas no secretado das células tumorais, e como podemos visualizar na **fig.30**, os anticorpos IgG foram capazes de reconhecer apenas a BpMP-I (controle positivo), em contrapartida os anticorpos IgY anti-BpMP- I foram capazes de reconhecer proteínas presente entre os padrões 52kDa e 76kDa.

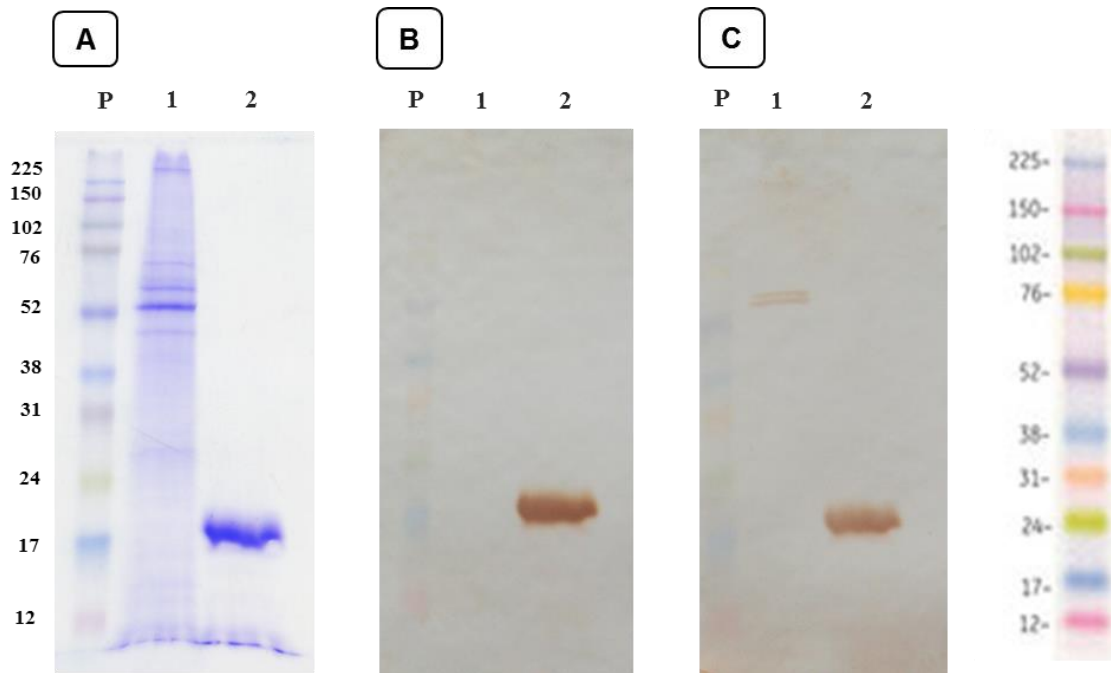


Figura 30 Perfil de reconhecimento de proteínas presentes no secretado de células tumorais MACL-1 por anticorpos policlonais IgG anti-BpMP-I e IgY anti-BpMP-I em western blotting: **(A)** PAGE-SDS (12,5%) em condições não redutoras, **(B)** Proteínas reconhecidas por IgG e **(C)** Proteínas reconhecidas por IgYs. **P**: marcador de massa molecular (Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers); **1**. Secretado das células MACL-1; **2**. BpMP-I.

V.DISSCUSSÃO

As metaloproteases são enzimas proteolíticas bastante difundidas nos mais diversos organismos vivos e sua presença nas peçonhas ofídicas pode gerar sérias complicações agravando o quadro sintomatológico do envenenamento, o qual é representado por efeitos sistêmicos (distúrbios da função plaquetária, coagulação sanguínea, dentre outros) e danos teciduais locais (hemorragias, inflamação e necrose).

Os acidentes ofídicos passaram a ser considerados pela Organização Mundial da Saúde integrantes do grupo de doenças tropicais negligenciáveis. As serpentes chegam a causar anualmente 5 milhões de vítimas, desses acidentes 125000 resultam em óbito e 400000 vítimas ficam com sequelas gravíssimas (amputação), que levam a altos impactos psicológicos e socioeconômicos. O tratamento com imunoglobulinas anti-peçonhas (soro antiofídico) é o único tratamento aceito para os envenenamentos por serpentes (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARREL, 2006; HARRISON et al., 2009; WHO, 2007)

A soroterapia consiste na administração parental de soros antiofídicos, os quais são preparações de imunoglobulinas ou fragmentos de imunoglobulinas capazes de reconhecer às toxinas da peçonha e de neutralizar os seus efeitos tóxicos. O desenvolvimento destes soros envolve a imunização de animais, principalmente cavalos, com inoculação das peçonhas para geração dos anticorpos (CARDOSO et al., 2003; LEÓN et al., 2011) e, subsequentemente a sangria desses animais para purificação das imunoglobulinas inteiras ou os fragmentos F(ab')₂ ou Fab (LALLOO, THEAKSTON, 2003; GUTIÉRREZ, LÉON, 2009).

No processo de produção dos soros antiofídicos, a capacidade das peçonhas em estimular respostas imunológicas no animal, é um quesito importante a ser considerado para obtenção de um melhor desempenho durante as imunizações (GUTIÉRREZ, LÉON, 2009). A geração da resposta imune pelas peçonhas de serpentes é dependente de vários fatores dentre eles as características físico-químicas individuais das toxinas, tais como a estrutura e massa molecular; abundância relativa na peçonha, a dose da mesma administrada nas imunizações; e fatores relacionados ao animal imunizado que determinam a capacidade do sistema imunológico do mesmo em reconhecer cada toxina, como a via de administração, a genética individual e a capacidade de processar as toxinas (SCHUNK, MACALLUM, 2005; LEÓN et al., 2011).

Outros aspectos de extrema importância para a produção dos antisoros são a escolha das espécies de serpentes como candidatas para a produção do soro antiofídico, levando em consideração a faixa de distribuição geográfica dessas espécies; a extensão geográfica e a variação ontogenética da peçonha dessas espécies em toda a sua área de distribuição, dentre outros fatores (GUTIÉRREZ et al, 2009).

A aplicação de técnicas proteômicas para analisar a capacidade de reconhecimento dos soros antiofídicos comerciais e a identificação das principais moléculas reconhecidas pelo soro, processo determinado como antivenômica, tem sido explorada com a finalidade de avaliar detalhadamente a eficácia dos antivenenos comerciais ou aqueles que ainda estão em testes pré-clínicos (GUTIÉRREZ et al., 2008; LOMONTE et al., 2008; CALVETE et al., 2009; CALVETE et al., 2011). Utilizando dessa abordagem, Antúnez e colaboradores (2010) mostraram que algumas proteínas das peçonhas de serpentes viperídeas não foram reconhecidas ou mesmo imunodepletadas (formar conjugados toxina e anticorpo e assim ser retirados por centrifugação) pelo soro antiofídico comercial, como as fosfolipases A₂, as CRISPs (proteínas secretórias ricas em cisteínas), serinoproteases, lectinas do tipo C ou mesmo as semelhantes à Lectinas (Lectinas-Like), e por fim, as metaloproteínases da classe PI. Outros estudos vieram a corroborar com os perfis de reconhecimento e não reconhecimento de diferentes soros antiofídicos comerciais (PLA; GUTIÉRREZ; CALVETE, 2012; SOUSA et al., 2013) e mostraram a necessidade de novas pesquisas que devem ser geradas para avaliar os grupos de proteínas não reconhecidas e assim buscar formas de sanar esses problemas.

Dessa forma, por apresentar alto rendimento de purificação, cerca de 2% da peçonha de *B. pauloensis*, a metaloprotease BpMP-I (Naves de Souza e colaboradores, 2012) foi utilizada nesse estudo como um antígeno para a produção de anticorpos policlonais anti-metaloprotease (IgG e IgY) em camundongos e galinhas, respectivamente para se avaliar a sua capacidade de produção e de reconhecimento de outras proteínas presentes em peçonhas botrópicas e crotálicas, além de analisar a produção e purificação de anticorpos através das galinhas, reduzindo a necessidade de causar a sangria em cavalos.

Inicialmente, procedeu-se a obtenção da toxina BpMP-I utilizando o mesmo protocolo pré-estabelecido por Naves de Souza e colaboradores (2012).

Após os dois passos cromatográficos, troca iônica (**fig.12A**) combinada com uma gel filtração (**fig.12C**), a BpMP-I foi obtida com alto grau de pureza (**fig.12D**) sendo sua homogeneidade confirmadas por cromatografia em fase reversa (dados não apresentados) e PAGE-SDS 12,5%. A proteína apresentou cadeia polipeptídica única com massa molecular de aproximadamente 25kDa quando analisada em PAGE SDS 12,5% na presença de agente redutor (**fig.12D**). A BpMP-I é uma metaloprotease da classe PI, capaz de hidrolisar diferentes substratos tais como a azocaseína e as cadeias α A e β B do fibrinogênio, não induz hemorragia e apresenta alta recuperação durante a purificação (NAVES DE SOUZA et al., 2012).

As metaloproteases de peçonha de serpente podem chegar a representar mais de 30% do total das peçonhas viperideas e são uma das principais toxinas responsáveis por causar alterações no sistema hemostático, além da hemorragia local e sistêmica (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; FOX; SERRANO, 2008; WAGSTAFF et al., 2009; SOUSA et al., 2013; GONÇALVES-MACHADO et al., 2015). A análise proteômica da peçonha de *B. pauloensis* mostrou que as metaloproteases representam 38,1% das proteínas identificadas, e que destas 12,2 % pertenciam a classe PI e 25,9% a classe PIII (RODRIGUES et al., 2012). O nosso grupo de estudo conseguiu isolar desta peçonha apenas três metaloproteases, a saber: BpMP-I (NAVES DE SOUZA et al., 2012) e BpMP-II (ACHÊ et al., 2014), ambas da classe PI e a Bothropoidina (GOMES et al., 2015) da classe PIII, uma metaloprotease altamente hemorrágica.

Após a verificação de homogeneidade da BpMP-I iniciaram-se os processos de imunizações dos animais, camundongos e galinhas, seguindo protocolos usuais da produção de soros comerciais. O procedimento foi monitorado semanalmente e verificou-se que o índice de reconhecimento do soro total da terceira semana (21º dia) dos camundongos da linhagem Balb-c apresentou IE=5,9 (**fig.13A**), em contrapartida no mesmo período de imunização as galinhas da raça *White Leghorn* apresentaram IE de 28,8 (**fig.15A**) indicando que a BpMP-I é mais imunogênica para aves. Os anticorpos produzidos pelas galinhas começaram a ser detectados nas gemas, ou seja, transferidos, a partir da quinta semana (35º dia) posterior a primeira imunização, e o IE (5,3) ficou próximo ao apresentado pelos camundongos na 3ª semana (**fig.15A e fig.15C**). Iniciada a transferência das IgY para as gemas, os ovos das semanas

posteriores a essa detecção foram coletados e agrupados, na última semana (63º dia) o IE chegou a 20,03, mostrando alto reconhecimento dos anticorpos IgY anti-BpMP-I contra o antígeno (**fig.15C**). Araújo e colaboradores (2010), assim como o grupo de Andrade (2013), apresentaram em seus estudos que a transferência dos anticorpos contra serpentes botrópicas, para a gema, iniciavam a partir do 35º dia após a primeira imunização.

Os ovos de galinhas são componentes comuns da nossa dieta e, portanto, toleradas pelo nosso sistema imune. Eles contêm todos os nutrientes e fatores necessários para o desenvolvimento do embrião, incluindo os anticorpos que são transferidos do sangue das aves para as gemas do ovo (YEGANI; KORVER, 2010). A produção de anticorpos em galinhas e a extração específica de anticorpos das gemas (IgY) tem atraído cada vez mais a comunidade científica como demonstrado no extenso crescimento literário que aborda as IgYs (SPILLNER et al., 2012). Os ovos representam uma fonte de obtenção alternativa de anticorpos para substituir os mamíferos utilizados nas produções em grande escala de soroterapia. Este não é apenas um processo caro, mas também está associado com o sofrimento e os efeitos colaterais severos causados aos cavalos imunizados (TIZARD, 2002; SPILLNER et al., 2012; DUBIE et al., 2015). Uma galinha pode produzir cerca 200mg de imunoglobulinas IgY / Kg / mês presentes na gema, em comparação com 10 mg IgG / kg / mês obtidos de cavalo imunizado (TALLEY; CARROLL, 1990; MOUSSA et al., 2012).

O perfil eletroforético dos anticorpos purificados e de suas etapas de purificação (**fig.14 e fig.16**) foi visualizado em PAGE-SDS 12,5% em condições redutoras. Os anticorpos purificados IgG e IgY apresentavam apenas as cadeias pesadas e cadeias leves (**fig.14B e fig.16B**), a partir desses resultados, podemos certificar a alta homogeneidade dos anticorpos produzidos no presente trabalho.

Anticorpos produzidos a partir de determinadas peçonhas ofídicas podem agir cruzadamente com toxinas presentes em espécies, gêneros e famílias diferentes das utilizadas na produção destes anticorpos (LIPPS & KHAN 2000). O anticorpo monoclonal anti-jararagina, específico para a região C-terminal do domínio desintegrina-Like de uma metaloprotease (Jararagina) da peçonha de *B. jararaca* foi capaz de reagir contra duas peçonhas das família *Colubridae* (TANJONI e colaboradores 2003). BEGHINI e colaboradores (2005)

confirmaram a habilidade de anti-soros produzidos em coelhos contra a crotoxina de *Crotallus durissus cascavella* em reconhecer a crotoxina de *C. d. terrificus* e BthTX-I de *B. jararacussu*. Denegri e colaboradores (2014) mostraram a capacidade de neutralização dos anticorpos anti-PLA₂ produzidos em coelhos capazes de neutralizar as atividades farmacológicas causadas pela peçonha de *B. alternatus*.

Os anticorpos purificados (IgG e IgY anti- BpMP-I) foram testados para verificar sua capacidade de reconhecimento frente as toxinas isoladas, peçonhas botrópicas e crotálicas. A partir dos dados obtidos, verificou-se que os anticorpos são específicos para a metaloprotease BpMP-I, pois ao testar a capacidade reativa dos anticorpos frente a BnSP-7 (fosfolipase A₂) os índices de reconhecimento ficaram abaixo de 1,2 (**fig.17**). Os dados de reatividade cruzada apresentados para a peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* também foram semelhantes aos da BnSP-7, uma vez que aproximadamente 80% da peçonha crotálica é constituída por fosfolipases A₂ (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

Ao testar a reatividade dos anticorpos IgG e IgY contra a BpMP-I, os índices ELISA ficaram em média 34,7 e 47,71, respectivamente, sendo que o reconhecimento da IgY foi significativamente maior, provavelmente porque diferentes epítomos da BpMP-I podem ser reconhecidos por esses anticorpos. Ao analisar o reconhecimento da IgG anti-BpMP-I contra diferentes peçonhas botrópicas, o IE das peçonhas de *B. pauloensis*, *B. diporus* e *B. jararaca*, apresentaram-se altos, enquanto que para a IgY anti-BpMP-I apenas a peçonha de *B. diporus* apresentou alto IE, semelhante ao da BpMP-I. Certamente durante a seleção dos epítomos, para a produção de anticorpos nos animais, diferentes regiões foram favorecidas. É possível que as regiões das proteínas reconhecidas pelos anticorpos IgG anti-BpMP-I sejam semelhantes aos encontrados na BpMP-I, enquanto que as reconhecidas pela IgY venham a ter baixa similaridade.

As análises de reatividade cruzada utilizando a técnica de *western blotting* demonstraram que os anticorpos IgG e IgY apresentaram um perfil de reconhecimento diferenciado frente as diversas peçonhas preparadas em condições redutoras e não redutoras (**fig.18 a fig.19**). Ao realizar o *western blotting* com amostras em condições não redutoras a resposta apresentada foi singular (**fig.19 e fig.21**), os anticorpos IgG e IgY anti-BpMP-I foram capazes de reconhecer proteínas presentes entre 52kDa e 150kDa, além daquelas

presentes na faixa entre 17kDa e 20kDa. A condição não redutora provavelmente conservou melhor a estrutura tridimensional das proteínas, favorecendo um melhor reconhecimento de epítomos semelhantes à BpMP-I presentes em componentes das diferentes peçonhas. O reconhecimento de diferentes proteínas na peçonha de *B. pauloensis* pelos dois tipos de anticorpos (**fig.18 e fig.19**) foram notoriamente distintos, e esses dados corroboraram com a diferença de IE entre a IgG e IgY para a mesma peçonha. Outro dado importante que corroborou com os dados do ELISA, foi o não reconhecimento de nenhuma proteína presente na peçonha de *C. durrisus collilineatus*.

Os anticorpos policlonais IgG e IgY anti-BpMP-I, provavelmente foram capazes de reconhecer proteínas como HF3 (SILVA et al, 2004), Jararagina (PAINE et al., 2003) e Botropasina (ASSAKURA et al, 2003) metaloproteases da classe PIII da peçonha de *B. jararaca* que apresentam massa molecular entre 47kDa a 70kDa e similaridade com domínio metaloproteases da BpMP-I, assim como as metaloproteases da classe PI, Botrojaractivase (BERGE; PINTO; GUIMARÃES, 2008) e BJ-PI (OLIVEIRA et al, 2009), ambas da mesma peçonha (**tabela 2**). Além dessas proteínas os anticorpos reconheceram as metaloproteases já caracterizadas da peçonha de *B. pauloensis*, a Botropoidina (GOMES et al., 2015) e a BpMP-II (ACHÊ et al, 2014) (**tabela 2**).

Os diferentes trabalhos antivenômicos apresentados na literatura (CALVETE et al., 2009; CALVETE, 2010; PLA; GUTIÉRREZ; CALVETE, 2012) mostraram que os soros antiofídicos comerciais não eram capazes de reconhecer ou depletar as metaloproteases da classe PI. Como demonstrado por Antúnez e colaboradores (2010) as metaloproteases da classe PI foram pouco imunodepletadas e não eram reconhecidas por *western blotting* enquanto que as PIII eram praticamente depletadas. Os mesmos autores sugeriram que as proteínas dessa classe deveriam ser adicionadas às soluções de preparo para as imunizações na produção dos anticorpos comerciais. Sousa e colaboradores (2013) mostraram que o soro antiofídico botrópico produzido pelo Instituto Butantan apresentava baixo reconhecimento para as metaloproteases da classe PI, sugerindo que estas proteínas tivessem baixa imunogenicidade ou até mesmo que o domínio catalítico das PIII seja mais imunogênico, ressaltando ainda que as SVMP-PI não devam ser negligenciadas, pois as mesmas podem

atuar na ativação dos fatores de coagulação e nas reações locais causadas no acidente ofídico (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MODESTO et al., 2005; SOUSA et al., 2013).

O potencial inibitório dos anticorpos anti-BpMP-I foi avaliado frente às atividades azocaseinolítica e hemorrágica. A hemorragia é uma das atividades biológicas mais proeminentes das SVMPs capaz de gerar danos sistêmicos e teciduais locais durante o envenenamento ofídico. A inibição da atividade proteolítica da BpMP-I sobre a azocaseína foi mensurada com diferentes proporções da toxina e anticorpos. Nas proporções 1:1 (toxina: anticorpos, $\mu\text{M}/\mu\text{M}$) os anticorpos já foram capazes de neutralizar a atividade proteolítica da metaloprotease. No entanto, somente na concentração 1:5 ($\mu\text{M}: \mu\text{M}$) houve diferença significativa entre a capacidade neutralizantes dos anticorpos IgG anti-BpMP-I e IgY anti-BpMP-I. A média de neutralização da atividade proteolítica das IgG anti-BpMP-I chegou a cerca de 85%, enquanto que as IgY neutralizaram aproximadamente 60% (**fig.22**). Provavelmente a capacidade de neutralização das IgGs presente maior do que as IgYs por reconhecerem com maior especificidade epítomos necessários para a catálise dessas proteínas. Alguns anticorpos são específicos para determinadas regiões, o MAJar 3, anticorpo monoclonal capaz de reconhecer epítomo do domínio semelhante a desintegrina e assim bloquear a capacidade desse domínio de se ligar ao colágeno, alterando a atividade da jararagina (TANJONI et al., 2003).

Os anticorpos anti-BpMP-I também foram capazes de neutralizar a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. pauloensis* (**fig.23**). As IgGs e IgYs puderam neutralizar 100% da atividade hemorrágica induzida pela peçonha na proporção 1:50 (peçonha:anticorpos, m/m) (**fig.24**) sugerindo que as imunoglobulinas testadas são capazes de reconhecer e de se ligarem a epítomos necessários para o desencadeamento da atividade hemorrágica. Semelhantemente, Rodrigues e colaboradores (2001) demonstraram que anticorpos produzidos em coelho anti-Neuwiedase, uma metaloprotease da classe PI isolada da peçonha de *B. neuwiedi* foram capazes de neutralizar 100% a atividade hemorrágica causada pela peçonha *B. neuwiedi* na mesma proporção de 1:50 (peçonha:anticorpos, m/m). Os anticorpos policlonais anti-peçonha bruta de *Daboia russelii* foram capazes de neutralizar a atividade hemorrágica causada pela mesma peçonha (KRISHNAN et al, 2015).

Cardoso (2008) construiu uma biblioteca de fragmentos de anticorpos recombinantes derivados de galinhas imunizadas com peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*. A biblioteca foi utilizada para selecionar fagos expressando fragmentos de anticorpos denominados scFvs ligantes das toxinas presentes na peçonha. Estes fragmentos também foram utilizados para inibir diversas atividades tóxicas causadas pela peçonha de *B. pauloensis*. Por meio de ensaios biológicos e enzimáticos, constatou-se a capacidade de uma das moléculas de scFv em inibir as ações hemorrágica e fibrinogenolítica da peçonha bruta e da neuwiedase isolada da peçonha de *B. neuwiedi*. Este trabalho foi útil para demonstrar o potencial das bibliotecas recombinantes de scFv na busca por anticorpos neutralizantes de relevantes toxinas animais, criando uma possibilidade na obtenção de anti-venenos ofídicos, sem utilização de animais como fonte de imunoglobulinas.

A antigenicidade cruzada entre componentes de peçonhas botrópicas foi inicialmente demonstrada por MOURA DA SILVA *et al.* (1990), por meio da técnica de *Western Blot*, sugerindo a existência de epítomos compartilhados nestas peçonhas. Provavelmente, os epítomos comuns decorrem do elevado grau de similaridades estruturais observadas entre as toxinas. As fosfolipases A₂, por exemplo, apresentam poucas variações de resíduos de aminoácidos entre as diferentes espécies botrópicas (NÚÑEZ, *et al.* 2004). O mesmo fato ocorre em relação às metaloproteases (HARRISON 2003). Em vista disso, no presente estudo foi avaliado as semelhanças estruturais entre a BpMP-I e diferentes metaloproteases já isoladas das peçonhas botrópicas avaliadas no presente estudo, cujas sequencias estão depositadas em banco de dados (**Tabela 2**).

Os anticorpos IgG e IgY foram acoplados independentemente a uma coluna de afinidade utilizando uma resina CNBr Sepharose ativada. Tais colunas foram utilizadas para isolar componentes da peçonha de *B. pauloensis* que interagiram com os anticorpos anti-BpPMP-I para sua posterior identificação por meio de ensaios de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas por Maldi/TOF/TOF. As colunas de afinidade IgG Sepharose e IgY Sepharose capazes de reter 8,5% e 10,4% das proteínas da peçonha total de *B. pauloensis*, respectivamente (**tabela 3**). As frações ligantes, denominadas P2IgG e P2IgY foram analisadas em géis bidimensionais e para cada amostra foram realizadas

triplicatas dos géis (**fig.26 e fig.27**). As combinações ou “match” resultaram em 20 proteínas ligantes da fração P2IgY e 23 proteínas ligantes de P2IgG. Em seguida, as amostras foram selecionadas para análise por espectrometria de massas em sistema MalDI/TOF/TOF. Como observado na **tabela 5**, onze proteínas provenientes da fração ligante da IgG Sepharose e onze proteínas da IgY Sepharose foram identificadas (**fig.28**). Dentre as proteínas identificadas da fração P2IgG, dez deram similaridade a lectinas e/ou lectinas-‘like’ e 1 fosfolipase A₂ básica (**tabela 4 e fig.28A**). É possível que as lectinas e lectinas-like identificadas nos géis bidimensionais sejam domínios estruturais que estão presentes nas metaloproteases da classe PIII_d (FOX; SERRANO, 2008), uma vez que foram identificadas proteínas como massa molecular acima de 50kDa no ensaio de western *blotting* em condição não redutora. A identificação de uma fosfolipase A₂ presente no spot 8 seja provavelmente proveniente de interações inespecíficas entre os anticorpos anti-BpMP-I acoplados a coluna de afinidade e a PLA₂ considerando que tais anticorpos não foram capazes de reconhecer esse grupo de proteínas como mostrado no teste ELISA e pelo *western blotting* (**fig.17, fig.18 e fig.19**).

A análise da fração P2IgY resultou na identificação de nove proteínas similares à lectina e/ou lectina-‘like’, uma fosfolipase A₂, resultados semelhantes aos dados obtidos pela análise dos ligantes da IgG-Sepharose, e por fim, uma metaloprotease da classe PIII (**tabela 4 e fig.28B**). Os resultados das análises de espectrometria de massas confirmam que os anticorpos anti-BpMP-I são capazes de reconhecer as diferentes SVMPs, no entanto dada limitação de obtenção de sinais de amostras no espectrômetro de massas alguns spots não foram identificados. A imunorreatividade existente entre os soros antiofídicos polivalente e diferentes peçonhas foi investigada por diferentes trabalhos antivenômicos. Os soros antiofídicos têm baixa capacidade de imunodepletar metaloproteases da classe PI, juntamente com outras proteínas de baixa massa molecular (GUTIÉRREZ et al., 2014). Esses trabalhos reforçam a importância e necessidade de enriquecer o soro antiofídico ou mesmo modificar os protocolos de imunização e adicionar essas proteínas com modificações que as tornem mais imunogênicas.

As metaloproteases das peçonhas de serpentes apresentam domínio catalítico semelhante ao das matrixinas e outras metaloproteases do grupo das

reprolisinas (GÖMIS-RUTH, 2009; CÉRDA-COSTA; GÖMIS-RUTH, 2014). E por causa dessa similaridade, buscamos verificar a detecção de metaloproteases em grupo de proteínas secretadas pelas células tumorais. Algumas matrixinas estão relacionadas com quadros patológicos, dentre eles a progressão do tumor (EGEBEAD; WERB, 2002; GONG; CHIPPADA-VENKATA; OH, 2014).

Diferentes microambientes assim como a produção de fatores tumorais podem contribuir para a progressão metastática (TALMADGE; FIDLER, 2010; VANHARANTA; MASSAGUE, 2013), e uma das principais causas envolvidas nesse processo são as metaloproteinases, incluindo a MMP2 que é uma proteína de 72 kDa integrante da subfamília das gelatinases capaz de degradar o colágeno presente na membrana basal (POLETTE et al, 1994; BATES et al., 2014). As MMP2 são altamente expressas numa variedade de tecidos malignos, em comparação com tecidos normais, tais como em câncer de mama, cólon, estomacal e pulmonar (PACHECO et al., 1998; MURASHIGE et al., 1996; NOMURA et al., 1996; BATES et al., 2014).

Com o intuito de identificar metaloproteases no secretado das células tumorais primárias (MACL-1) inicialmente foram realizados ensaios de zimogramas para verificar a presença de atividade gelatinolítica, capacidade verificada pela MMP-2 e MMP-9 (SILVA et al., 2014). Proteínas do secretado foram capazes de degradar a gelatina presente no gel (**fig.29**), baseada na migração eletroforética pode ser uma MMP2, que apresenta massa molecular de 72kDa.

Os anticorpos anti- BpMP-I foram capazes de reconhecer proteínas presentes no secretado das células tumorais. Os anticorpos IgY anti-BpMP-I, (**fig.30C**) reconheceram proteínas do secretado com faixa de massa molecular semelhante às proteínas que apresentaram atividade gelatinolítica, no entanto as IgGs não foram capazes de reconhecer nenhuma proteína.

Atividade das MMPs é equilibradamente regulada e alterações em sua ação podem gerar distúrbios com efeitos drásticos. Por conseguinte, a regulação da atividade das MMPs tem fundamental papel e está correlacionada com várias doenças, tornando-as atrativos alvos terapêuticos (ROOSMARIJN; VANDENBROUCKE; LIBERT, 2014). Afim de compreender o papel exercido por essas proteínas tanto em organismos saudáveis quanto em doentes, é

necessário o desenvolvimento de ferramentas que possam avaliar a atividade e expressão das MMPs em diferentes fases da doença (IYER et al., 2012). As pesquisas têm se concentrado em analisar a MMP-2 e MMP-9, não por serem as mais importantes, mas principalmente pela falta de anticorpos específicos para MMPs e a facilidade de detectar sua atividade por zimografia (LINDSEY; ZAMILPA, 2012; ROOSMARIJN; VANDENBROUCKE; LIBERT, 2014).

Nossos resultados demonstraram que os anticorpos policlonais específicos anti-BpMP-I produzidos em camundongos e galinhas foram eficientes em reconhecer metaloproteases e fragmentos das mesmas em peçonhas botrópicas (imunorreatividade cruzada), bem como apresentaram um potencial inibitório significativo sobre a ação enzimática e o efeito hemorrágico induzido por metaloproteases hemorrágicas. Adicionalmente, tais anticorpos se mostraram ser excelentes ferramentas moleculares na identificação de outras metaloproteases presentes em outras secreções biológicas. Estudos como este podem abrir perspectivas para resoluções na atual imunoterapia dos acidentes ofídicos, de modo a construir modelos de anticorpos candidatos à inclusão dos soros antiofídicos, elevando-se a eficiência destes soros na redução ou anulação dos efeitos locais induzidos pela peçonha. Além disso, pesquisas envolvendo a utilização de anticorpos policlonais específicos podem ser úteis na bioprospecção de mímétopos de peptídeos de toxinas relacionados ao envenenamento ofídico ou de toxinas/proteínas associadas a outras patologias como o câncer e doenças degenerativas nas quais metaloproteases endógenas possam estar envolvidas.

VI. CONCLUSÃO

A partir do presente trabalho, conseguimos verificar que a BpMP-I foi capaz de induzir a síntese de anticorpos nos camundongos e nas galinhas da raça *White Leghorn*. Após o isolamento dos anticorpos anti-BpMP-I (IgG e IgY), averiguamos que os mesmos eram capazes de reconhecer em diferentes graus proteínas presentes nas peçonhas botrópicas que fossem semelhantes a BpMP-I, constatado a alta similaridade das proteínas da classe das metaloproteases. Os anticorpos se mostraram ótimos inibidores da atividade proteolítica da BpMP-I sobre a azocaseína e também foram capazes de neutralizar totalmente a atividade hemorrágica causada pela peçonha bruta de *B. pauloensis*, apresentando uma promissora aplicação terapêutica contra acidentes ofídicos. Verificamos também a capacidade de reconhecimento desses anticorpos ao acoplá-los em resinas cromatográficas, mostrando que é possível utilizá-los na purificação de proteínas da classe das metaloproteases. Adicionalmente, esses anticorpos se mostraram ser excelentes ferramentas moleculares no reconhecimento de outras metaloproteases presentes em outras secreções biológicas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APTE, S.S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. **Journal Biological Chemistry**, v. 284, p. 31493-31497, 2009.

BECH, I. T. The role of pancreatic enzymes in digestion. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 26, p. 311- 325, 1973.

BECKER, A.B.; ROTH, R.A. Identification of glutamate 169 as the binding third zinc residue in proteinase III, a member of the family of insulin-degrading enzymes. **Biochemistry Journal**, v. 292, p. 137-142, 1993.

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

BLOBEL, C.P. Metalloprotease- disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. **Cell**, v. 90, 589-592, 1997.

BOCHTLER, M.; ODINTSOV, S.G.; MARCYJANIAK, M.; SABALA, I. Similar active sites in lysostaphins and D-Ala-D-Ala metallopeptidases. **Protein Science**, v. 13, p. 854-861, 2004.

BODE,W.; GOMIS-RUTH, F.X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, v. 331, p. 134-140, 1993.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 23, p. 9971–9986, 2015.

CALVETE, J. et al. Omics Meets Biology: Application to the Design and Preclinical Assessment of Antivenoms. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3388–3405, 15 dez. 2014.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 2, p. 227–40, 6 mar. 2009a.

CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomomics, antivenomics. **FEBS letters**, v. 583, n. 11, p. 1736–43, 5 jun. 2009b.

CALVETE, J. J. et al. Antivenomic assessment of the immunological reactivity of EchiTAb-Plus-ICP, an antivenom for the treatment of snakebite envenoming in sub-Saharan Africa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 6, p. 1194–1201, 2010.

CALVETE, J. J. Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1284–1291, 2010.

CALVETE, J. J. et al. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 4, p. 510–27, 1 abr. 2011.

CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert Review of Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 739–758, 9 dez. 2011.

CAL, E.; OBAYA, A.J.; LLAMAZARES, M.; GARABAYA, C.; QUESADA, V.; LÓPEZ-OTÍN, C. Cloning, expression analysis and structural characterization of seven novel human ADAMs a Family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domain. **Gene**, 283, 49-62, 2002.

CERDÀ-COSTA, N.; GOMIS-RÜTH, F.X. **Protein Science**, v. 23, p.123 – 144, 2014.

CORONADO, M.A.; MORAES, F.R.; ULLAH, A.; MASSOD, R.; SANTANA, V.S.; MARIUTTI, R.; BROGNARO, H.; GEORGIEVA, D.; MURAKAMI, M.T.; BETZEL, C.; ARNI, R.K. Three-dimensional structures and mechanisms of snake venom serine proteinases, metalloproteinases, and phospholipase A₂s. **Toxinology**, v. 17, p. 1-25, 2014.

DEVY, L.; HUANG, L.; NAA, L.; YANAMANDRA, N.; PIETERS, H.; FRANS, N.; CHANG, E.; TAO, Q.; VAHOVE, M.; LEJEUNE, A.; VANGOOL, R.; SEXTON, D.J.; KUANG, G.; RANK, D.; HOGAN, S.; PASMANY, C.; MA, Y.L.; SCHOONBRODT, S.; NIXON, A.E.; LADNER, R.C.; HOET, R.; HENDERIKS, P.; TNHOOR, C.; RABBANI, S.A.; VALENTINO, M.L.; WOOD, C.R.; DRANSFIELD, D.T. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion and angiogenesis. **Cancer Research**, v. 69, p. 1517-1526, 2009.

DOLLERY, C. M.; LIBBY, P. Atherosclerosis and proteinase activation. **Cardiovascular Research**, vv. 69, p. 625- 635, 2006.

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.

FRITSCHÉ, E.; PASCHOS, A.; BEISEL, H.G.; BOCK, A.; HUBER, R. Crystal structure of the hydrogenases maturing endopeptidase HYBD from *Escherichia coli*. **Journal Molecular Biology**, v. 288, p. 989-998, 1999.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos . **Ministério da Saúde-Brasil**. 112 pp, 2001
GÖMIS-RUTH, F. X. Structural aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. **Molecular Biotechnology**, v. 24, p.157 – 2002, 2003.
GÖMIS-RUTH, F. X. Structure and mechanism of metalocarboxypeptidase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 319- 345, 2008.

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

GÖMIS-RUTH, F.X.; BOTELHO, T.O; BODE, W. A stadad orientation for metallopeptidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 157-163, 2012.

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.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role 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.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 165–182, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. **Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach** **Toxicon**, 15 dez. 2010.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Immunological profile of antivenoms: Preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 340–350, 2014.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, p. 1223–1235, 2010.

GUTIÉRREZ, J.; LÉON, G. Snake antivenoms. Technological, Clinical and Public Health Issues. In: DE LIMA, M. E. et al. (Eds.). . **Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology**. Belo Horizonte: UFMG, 2009. p. 800.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958–975, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. Improving antivenom availability and accessibility: science, technology, and beyond. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 60, n. 4, p. 676–87, 15 set. 2012.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 7, p. 976–87, 1 dez. 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. **Biologicals**, v. 39, n. 3, p. 129–142, 2011

HOET, R.M.; COHEN, E.H; KENT,R.B.; ROOKEY, K.; SCHOONBRODT, S.; HOGAN, S. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 344-348, 2005.

HOOPER, N.M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Letters**, v. 354, p. 1-6, 1994.

JANG, W.; MA, T.; SU, X.; QIU, P.; YAN, G. Enzymatic activities and functional characterization of a novel recombinant snake venom proteinase from *Agkistrodon acutus*. **Biochimie**. v. 91, p. 277-287, 2009.

KAIMAL, R.; ALJUMAILY, R.; TRESSEL, S.L.; PRADHAN, R.V.; COVIC, L.; KULIOPULOS, A.; ZARWAN, C.; KIM, Y.B.; SHARIFI, S.; ARGAL, A. Selective blockade of matrix metalloprotease-14 with a monoclonal antibody abrogates invasion, angiogenesis, and tumor growth in ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 73, p. 2457-2467, 2013.

KAWAGUCHI, N.; XU, X.; TAJINA, R. et al. ADAM 12 protease induces adipogenesis in transgenic mice. **The American Journal of Pathology**, v. 160, p. 1895-1903, 2002.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disitegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, p. 265-293, 1992.

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.

LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, C.M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** , v. 3, p. 509-519, 2002.

MASKOS, K.; BODE, W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases. **Molecular Biotechnology**, v. 25, p. 241-266.

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

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

MCKERROW, J.H. Human fibroblast collagenase contains an amino acid sequence homologous to the zinc-binding site of Serratia proteases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 5943-5943, 1987.

MOCHIZUKI. S.; OKADA, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. **Cancer Science**, v. 98, p. 521-527, 2007.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 4, 128-135, 2008.

NALIVAEVA, N.N.; FISK, L.R.; VELYAEV, N.D.; TURNER , A.J. Amyloide-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 5, p. 212-224, 2008.

NEURATH, H. Limited proteolysis and zymogen activation, in *Proteases and Biological control*. (Reich, E; Rifkins, D.B.; Shaw ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, v. 2, p. 51-64, 1975.

NEURATH, H; WALSH, K, A., Role of proteolytic enzyme in biological regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, p. 3825-3832, 1976.

PLA, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Second generation snake antivenomics: comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 60, n. 4, p. 688–99, 15 set. 2012.

PONGPIT, J. et al. The role of prothrombin time (PT) in evaluating green pit viper (*Cryptelytrops* sp) bitten patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 7, p. 415–418, 2012.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. **Science**, v. 296, 2183-2185.

RAMOS, O.H.P; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 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.; WALLER, M.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 503-509, 2014.

RODRIGUES, R.S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.P.P.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; RODRIGUES, V.M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2707- 2720, 2012.

RODRIGUES, V. et al. Bothrops pauloensis Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 670–684, 10 mar. 2015.

RONCOLATO, E. C. et al. Phage display as a novel promising antivenom therapy: A review. **Toxicon**, v. 93, p. 79–84, 2015.

ROOSMARIJN, E.; VANDENBROUCKE; LIBERT, C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? **Nature Reviews Drug Discovery**, doi: 10.1038/nrd4390, 2014.

SLACK, B.E.; MAS, L.K.; SEAH, C.C. Constitutive shedding of amyloid precursor protei ectodomain is up-regulate by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. **Biochemistry Journal**, v. 357, 787-794, 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 Cys 73 active-site zinc complex in latency and “cysteine switch” mechanism for activation. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 1, p. 364-368, 1990.

STÖCKER, 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.

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**, v. 1824, p. 164-176, 2012.

TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Proteases that induce hemorrhage, in: G.S. Bailey (Ed.) **Enzymes from Snake Venom**, Alake, Colorado, p. 11-38, 1998.

THEAKSTON, R. D. G.; LAING, G. D. Diagnosis of snakebite and the importance of immunological tests in venom research. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1667–1695, 2014.

TIZARD, I. The avian antibody response. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 11, n. 1, p. 2–14, 2002.

TOCCHI, A.; PARKS, W. C. Functional interactions between matrix metalloproteinases and glycosaminoglycans. **FEBS Journal**, v. 280, n. 10, p. 2332–2341, 2013.

TREVISAN-SILVA, D. et al. Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. **Toxicon**, v. 76, p. 11–22, 2013.

TU, A. T.; BAKER, B.; WONGVIBULSIN, S.; WILLIS, T. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. **Toxicon**, v. 34, p. 1295-1300, 1996.

VALENTA, J.; STACH, Z.; OTAHAL, M. Protobothrops mangshanensis bite: First clinical report of envenoming and its treatment. **Biomedical Papers**, v. 156, n. 2, p. 183–185, 2012.

VEJAYAN, J.; KHOON, T. L.; IBRAHIM, H. Comparative analysis of the venom proteome of four important Malaysian snake species. **The journal of**

venomous animals and toxins including tropical diseases, v. 20, n. 1, p. 6, 2014.

WALKER, J. . **The Protein Protocol Handbook**. [s.l.] Humam Press Journal, 1996.

WEN, J. et al. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. **Antiviral Research**, v. 93, n. 1, p. 154–159, 2012.

WHITE, R. **Avian Immunology**. [s.l: s.n.]. v. 37

WILLIAMS, D. et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9708, p. 89–91, 2 jan. 2010.

WOLFSBERG, T.G.; STRAINGHT, P.D.; GERENA, R.L.. ADAM, a widely distributed and developmentally regulate gene family encoding membrane proteins with A Disintegrin And Metalloprotease domain. **Dev Biology** , v. 169, 378-383, 1995.

WORLD HEALTH ORGANISATION. These Guidelines were adopted by the WHO Expert Committee on Biological Standardization at its 59th meeting which took place in Geneva from 13 to 17 October 2008 and will be published in the WHO Technical Report Series . p. 1–134, 2010.

XU, Y. et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 860–868, 2011.

YAMASHITA, K. M. et al. Bothrops jararaca Venom Metalloproteinases Are Essential for Coagulopathy and Increase Plasma Tissue Factor Levels during Envenomation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.

YOU, W.-K. et al. Functional roles of the two distinct domains of halysase, a snake venom metalloprotease, to inhibit human platelet aggregation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 339, n. 3, p. 964–70, 20 jan. 2006.

YUYIBETH, M. P. et al. 217. IgY Antibodies Anti-Crotalus durissus cumanensis Venom: Purification and Neutralization Efficacy. **Toxicon**, v. 60, n. 2, p. 206–207, 2012.

ZASTROW, M. L.; PECORARO, V. L. Designing hydrolytic zinc metalloenzymes. **Biochemistry**, v. 53, n. 6, p. 957–978, 2014.

ZELANIS, A. et al. Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome / Peptidome of Bothrops jararaca Reveals Different Strategies to Deal with Prey. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2278–2291, 2010.

ZHANG, T. et al. Theoretical insights into the functioning of metallopeptidases and their synthetic analogues. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 2, p. 192–200, 2015.

ZIGRINO, P. et al. The Reprölysin Jararhagin, a Snake Venom Metalloproteinase, Functions as a Fibrillar Collagen Agonist Involved in Fibroblast Cell Adhesion and Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 43, p. 40528–40535, 25 out. 2002.