Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Andrezza Neves Gonçalves

Investigação do mecanismo bioquímico in vitro da interação da metaloprotease da matriz 2 (MMP-2) com o receptor beta 1 adrenérgico

Ribeirão Preto, SP

2018

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Investigação do mecanismo bioquímico in vitro da interação da metaloprotease da matriz 2 (MMP-2) com o receptor beta 1 adrenérgico

Versão corrigida

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora:

Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

´

Ribeirão Preto, SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Gonçalves, Andrezza Neves

Investigação do mecanismo bioquímico in vitro da interação da metaloprotease da matriz 2 (MMP-2) com o receptor beta 1 adrenérgico, 2018.

79p. : il. ; 30 cm

Tese, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Versão corrigida. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Gerlach, Raquel Fernanda.

1.MMP-2. 2.Receptor beta 1 adrenérgico. 3.Dobutamina. 4.Doxiciclina. 5.Cardiomiócitos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andrezza Neves Gonçalves

Investigação do mecanismo bioquímico in vitro da interação da metaloprotease da matriz 2 (MMP-2) com o receptor beta 1 adrenérgico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 25/10/2018

Banca examinadora:

Prof. Dra: Raquel Fernanda Gerlach

Instituição: FORP/USP Assinatura: _____

Prof. Dr: Hamilton Cabral

Instituição: FMRP/USP Assinatura: _____

Prof. Dra: Andréia Machado Leopoldino

Instituição: FCFRP/USP Assinatura: _____

Prof. Dr: Marcelo Damario Gomes

Instituição: FMRP/USP Assinatura: _____

Prof. Dr: João Paulo Mardegan Issa

Instituição: FORP/ USP Assinatura: _____

Janu

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Andrezza Neves Gonçalves no Programa: Bioquímica, do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 25 dias do mês de outubro de 2018, no(a) FMRP-USP realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Andrezza Neves Gonçalves, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Investigação do mecanismo bioquímico in vitro da interação da metaloprotease da matriz 2 (MMP-2) com o receptor beta 1 adrenérgico"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Raquel Fernanda Gerlach	Presidente	FORP - USP	Aprovado
Marcelo Damario Gomes	Titular	FMRP - USP	Aprovado
Andréia Machado Leopoldino	Titular	FCFRP - USP	Aprovado
Hamilton Cabral	Titular	FCFRP - USP	Aprovado
João Paulo Mardegan Issa	Suplente	FORP - USP	Aprovado

Resultado Final: Aprovada

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Mauro Henrique Leoni Bernardo _____, lavrei a presente ata, que assi juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 25 dias do mês de outubro de 2018.

Marcelo Damario Gomes

Andréia Machado Leopoldino

Hamilton Cabral

João Paulo Mardegan Issa

Raquel Fernanda Gerlach
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em _____ e, portanto, o(a) aluno(a) _____ jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Bioquímica.

_____
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

Ao meu filho, Bernardo, por me ensinar a sorrir nos momentos difíceis!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar em todos os momentos com seus “pontos de luz”!

À Prof^{a}. Dr^{a}. Raquel Fernanda Gerlach pela oportunidade de crescimento, tanto pessoal quanto profissional!

Às técnicas: Júnia Ramos e Aline Aparecida Ferrarese Tiballi por todo apoio técnico!

Ao meu primeiro orientando, Wasim Aluísio Prates Syed, minha eterna gratidão aos momentos que passamos juntos. Acredito que na vida o aprendizado é horizontal, por isso, mais aprendi do que ensinei. Continue com essa vontade de fazer diferente, se esforce e estude cada vez mais. Obrigada por me debutar como orientadora!

À 3ª turma de Ciências Biomédicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) que tive a honra de estagiar como aluna PAE. A cada um de vocês espero ter deixado um pouquinho do meu conhecimento, pois com toda certeza levo um pouquinho de cada um comigo. Obrigada por todas as vezes que eu quase “enfartei” nas nossas aulas práticas rs!

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral por disponibilizar seu laboratório para o processo de purificação da rhMMP-2. Sempre digo que, para mim, você é o “cara” quando o assunto é purificação. Gratidão por todo tempo dispendido conosco!

Aos membros do laboratório de Tecnologia Enzimática: Nathalia (Nath) e Youssef. Gratidão por todo apoio técnico, sugestões e colaborações no momento mais difícil da caminhada, com toda certeza vocês foram muito importantes!

À Prof^{a}. Dr^{a}. Adriana Franco Paes Leme e sua equipe por realizarem a espectrometria de massas das amostras de peptídeos.

Ao Professor Dr. José Eduardo Tanus-Santos e suas alunas: Karina Coutinho Ferraz e Daniele; e a professora Drª Elen Rizzi Sanchez pela colaboração nos experimentos de Western blotting.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia onde realizei meus créditos e todas as minhas disciplinas, meu estágio docência (PAE) e também à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, local onde fiz a parte experimental deste trabalho, minha gratidão!

Às secretárias: Maria Ivone Campos Fonseca, Rosemeire Ferreira da Costa Gonçalves e Clélia Aparecida Celino. Gratidão por toda ajuda nesses 4 anos! Ivone, obrigada pela paciência!

À Andressa Barban do Patrocínio, parceira e dupla em todos os trabalhos... Minha eterna gratidão por sua amizade!

Ao meu coordenador Prof. Dr. Vitor Marcel Faça. Sem exageros, só estou aqui por causa da sua intervenção. Gratidão por ter agido de forma rápida; ainda tenho um bom caminho a percorrer até a alta, mas vai passar!

Aos meus pais, Ivanilda e Osmar, e irmãos, Ana Paula e Michel. A vida nos mostra o quanto somos diferentes e ao mesmo tempo iguais. Gratidão pelo colo nos momentos difíceis, pelo afago, pelo sermão quando necessário e pelo silêncio educador. Não existem palavras suficientes para expressar minha gratidão!

Ao meu filho, Bernardo, parceiro de todas as horas e principalmente neste momento final. Minha eterna gratidão por dividir minha caminhada contigo e ajudar a mamãe lembrar as coisas.

Ao Tom, meu filhote de 4 patas e garras afiadas. Gratidão por ser esse gato tão carinhoso.

Ao meu esposo, Edder, “minha brisa leve”, gratidão por seguir ao meu lado e pelos nossos “cinco minutinhos”!

Aos melhores amigos do mundo: Ana Claudia Siqueira, Ana Paula Borges Battel, Emeline Campanini Boni, Fernanda Travaini de Lima, Jéssica dos Santos, Lucas Otávio Peres, Maria Laura Pereira, Mariana Lima, Tamara Ângelo Damasceno. Vocês são incríveis e únicos em minha vida, gratidão por todas as horas dedicadas

a mim e por estarem sempre disponíveis a me ouvir! Não estaria aqui sem a ajuda de vocês.

Aos amigos do núcleo de Reiki Clara de Assis, especialmente Marli Kiss e todos da Caravana Batuíra, especialmente Maria Angélica Olivon, por me ajudarem nesta caminhada!

Às agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto e de outros trabalhos do nosso laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Sou como você me vê

Posso ser leve como uma brisa ou forte

como uma ventania.

Depende de quando e como você me vê

passar.

Clarice Lispector

GONÇALVES, A.N. Investigação do mecanismo bioquímico in vitro da interação da metaloprotease da matriz 2 (MMP-2) com o receptor beta 1 adrenérgico. 2018. 76f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

RESUMO

As metaloproteases da matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas que participam da degradação da matriz extracelular no organismo de vertebrados. Estudos mostram a grande importância dessas enzimas no processo de remodelação do tecido cardíaco, além de sugerirem a participação da MMP-2 em doenças cardiovasculares. Em estudo recente foi demonstrado que as MMPs clivam o receptor β2-adrenérgico, contribuindo para o aumento do tônus arteriolar de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Acredita-se que processo semelhante possa ser verificado em relação ao receptor β-1 adrenérgico e proteínas das junções, que são fundamentais para o funcionamento do coração. As análises *in sílico* realizadas mostraram regiões prováveis de clivagem pela metaloprotease da matriz 2 humana recombinante (rhMMP-2) na porção extracelular, especificamente na região N-terminal deste receptor, no entanto, as análises de comparação de similaridade de substratos não apresentaram resultados significativos, embora os resultados preliminares obtidos no teste *in vitro* mostraram que houve hidrolise logo no início do peptídeo sintético ASPPASLLPPAS, entre os resíduos alanina e serina, entre as duas prolinas e por fim entre o resíduo de prolina e alanina, regiões com grandes chances de ocorrer a hidrólise, pois o substrato nativo desta enzima é o colágeno que é composto por uma cadeia polipeptídica com uma sequência de repetições onde geralmente temos glicina-X-Y, onde X normalmente é uma prolina e Y frequentemente uma hidroxiprolina, e raramente lisina e hidroxilisina, no entanto a replicação deste experimento não apresentou o mesmo resultado. Já os resultados obtidos no *western blotting* mostraram que a expressão do receptor é diminuída quando os cardiomiócitos são previamente tratados com 40mM e 120mM de rhMMP-2 e esse efeito tem uma reversão significativa quando as células são previamente tratadas com inibidores doxiciclina ou ONO-4817, corroborando com os trabalhos apresentados na literatura em que a rhMMP-2 atua no receptor β1adrenérgico.

Palavras chaves: rhMMP-2; receptor β1adrenérgico; dobutamina, cardiomiócitos.

GONÇALVES, A.N. Investigation on the in vitro biochemical mechanism involved in the interaction of matrix metalloproteinaise 2 (MMP-2) with the beta 1 adrenergic receptor. 2018. 76f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) are proteolytic enzymes that participate in the degradation of the extracellular matrix in the vertebrate organism. Studies show the great importance of these enzymes in the remodeling process of cardiac tissue, besides suggesting the participation of MMP-2 in cardiovascular diseases. In a recent study, MMPs were shown to cleave the β2-adrenergic receptor, contributing to the increase in arteriolar tone of spontaneously hypertensive rats (SHR). It is believed that a similar process can be verified also in the β-1 adrenergic receptor and junction proteins, which are fundamental to the heart function. The in situ analyzes performed revealed sections prone to be cleaved by matrix metalloproteinase 2 recombinant human (rhMMP-2) in the extracellular portion, specifically in the N-terminal region of this receptor, however, the comparative analyzes of the similarity of substrates did not present significant results, but those obtained in the in vitro test showed that there was hydrolysis right at the beginning of the synthetic peptide ASPPASLLPPAS, between alanine and serine residues, between the two proline and finally between the proline residue and alanine. Hydrolysis among proline residues was expected, even though it was not predicted for in silica cleavage, since the native substrate of this enzyme is collagen, which is composed of a polypeptide chain with a sequence of repetitions in which it usually has glycine-XY, where X usually is a proline and Y often a hydroxyproline, and rarely lysine and hydroxylysine, however the replication of this experiment di not present the same result. The obtained results in western blotting have presented that receptor expression is decreased when cardiomyocytes are pretreated with 40mM and 120mM rhMMP-2 and this effect has a significant reversion when cells are pretreated with doxycycline or ONO-4817 inhibitors, supporting previous studies which demonstrate that rhMMP-2 acts on the β 1 adrenergic receptor.

Keywords: MMP-2; β1adrenergic receptor; dobutamine, cardiomyocytes.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/Ala	Alanina
AMPc	Adenosina 3´,5´-monofosfato cíclico
AVC	Acidente vascular cerebral
E/Glu	Ácido glutâmico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
F/Phe	Fenilalanina
G/Gly	Glicina
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
H/His	Histidina
I/Ile	Isoleucina
K/Lys	Lisina
L/Leu	Leucina
M/Met	Metionina
MEC	matriz extracelular

P/Pro	Prolina
mM	Milimolar
Q/Gln	Glutamina
R/Arg	Arginina
rhMMP-2	Metaloprotease da matriz 2 humana recombinante
S/Ser	Serina
kDa	Quilodalton
Tween 20®	Polissorbato 20
V/Val	Valina
W/Trp	Triptofano
WHO	World Health Organization
Y/Tyr	Tirosina
β1-AR	Receptor β1-adrenérgico
βARK	rodopsina quinase β-adrenérgico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Organização dos domínios das MMPs **9**

Figura 2- Representação da ativação de um GPCR **16**

Figura 3- Modelo de distribuição do β-AR na membrana plasmática **21**

Figura 4- Alinhamento da sequência de aminoácidos do receptor β1-AR de *Rattus norvergicus* (Rn) e *Mus musculus*. **34**

Figura 5- Alinhamento da sequência de aminoácidos do receptor β1-AR de *Rattus norvergicus* (Rn) e *Homo sapiens* (Hs). **35**

Figura 6- Clivagem *in sílico* do receptor β1AR de *Rattus norvegicus, Mus musculus* e *Homo sapiens* realizada utilizando a plataforma CLEVPREDICT **36**

Figura 7- Alinhamento *in sílico* do receptor β1AR e a glicoproteína elastina realizada utilizando a plataforma BLASTp suíte 2-sequences (NCBI). **37**

Figura 8- Alinhamento *in sílico* do receptor β1AR e a proteína agrecana realizada utilizando a plataforma BLASTp suíte 2-sequences (NCBI) Em (A) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e agrecana de *Mus muscullus* ; (B) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e agrecana *Homo sapiens*. **38**

Figura 9- Alinhamento *in sílico* do receptor β1AR e a proteína laminina realizada utilizando a plataforma BLASTp suíte 2-sequences .Em (A) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e laminina de *Mus muscullus* ; (B) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e laminina *Homo sapiens*. **38**

Figura 10- Alinhamento *in sílico* do receptor β1AR e a proteína agrecana realizada utilizando a plataforma BLASTp suíte 2-sequences (NCBI). Em (A) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e agrecana de *Mus muscullus* ; (B) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e agrecana *Homo sapiens*. **39**

Figura 11- Fluorescência da rhMMP-2, t (s) x RFU. **41**

Figura 12- *Western blotting* do receptor β1-AR com anticorpo monoclonal anti- β1-AR controle β1-actina, tratamento com 120mM de rhMMP-2, com ou sem inibidores **44**

Figura 13- *Western blotting* do receptor β1-AR com anticorpo monoclonal anti- β1-AR controle β1-actina, tratamento com 40mM de rhMMP-2, com ou sem inibidores. **44**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 02

1.1. PROTEÓLISE 03

1.2. FAMÍLIAS DE PROTEASES 07

1.2.1 SERINO PROTEASES 07

1.2.2 ASPARTIL PROTEASES 07

1.2.3 CISTEÍNO PROTEASES 08

1.2.4 METALOPROTEASES 08

1.2.4.1 METALOPROTEASE DA MATRIZ 11

1.2.4.2 METALOPROTEASE DA MATRIZ 2 (MMP-2) 12

1.3. DOENÇAS CARDIOVASCULARES 14

1.4. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G (GPCRS) 19

1.4.1 RECEPTOR B1-ADRENÉRGICO (β1-AR) 19

2.OBJETIVOS 25

3. MATERIAL E MÉTODOS 27

3.1. METALOPROTEASE DA MATRIZ 2 HUMANA RECOMBINATE (rhMMP-2) **27**

3.2. ESTUDO *IN SÍLICO* DO RECEPTOR B-1 ADRENÉRGICO **27**

3.3. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS COM BASE NOS PROVÁVEIS SÍTIOS DE CLIVAGEM **27**

3.4. CULTURA PRIMÁRIA DE CARDIOMIÓCITOS **28**

3.5. DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RECEPTOR BETA 1 ADRENÉRGICO POR *WESTERN BLOTTING* **29**

3.6. ENSAIO FLUORIMÉTRICO **31**

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA **31**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **34**

5. CONCLUSÃO **47**

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **49**

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Segundo a *World Health Organization* (WHO) as doenças cardiovasculares são as principais causas de mortes no mundo, aproximadamente 31% das mortes tiveram sua origem em uma doença cardiovascular (WHO, 2017).

Estudos epidemiológicos têm sugerido que dentro os fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares muitos estão relacionados ao estilo de vida, como uma alimentação rica em energia, tabagismo e principalmente o sedentarismo (SHI et al, 2016; RIBEIRO et al, 2016). Esses fatores elevam à produção sistémica de agonistas dos receptores acoplados a proteína G que são vasoconstritores, como as catecolaminas e a angiotensina II.

A concentração patológica desses agonistas regula positivamente a expressão gênica e a atividade proteolítica de metaloproteases da matriz (MMPs) e desintegrina e metaloprotease (ADAMs) (BERRY et al, 2013). As respostas cardíacas frente a expressão patológica destas enzimas pode ser: crescimento hipertrófico e fibrose, migração, proliferação e apoptose da musculatura vascular lisa, além da formação de aterosclerose e aneurismas.

Paradoxalmente a super expressão dessas enzimas podem afetar a integridade dos receptores adrenérgicos nas suas regiões extracelulares. Uma possibilidade é que essas proteases clivem a região extracelular destes receptores.

Seguindo esta linha de pensamento, Rodrigues et al, (2010), demonstraram que as MMPs clivam o receptor β2- adrenérgico (β2-AR), contribuindo para o aumento do tônus arteriolar de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e isso se deve ao fato de sua ação não estar restrita somente a degradação da matriz

extracelular, mas também a ativação de receptores de membrana celular, como os adrenoreceptores (PRENZEL et al.,1999). Desta forma, quando o corpo apresenta uma expressão patológica dessas enzimas, no caso das doenças cardiovasculares, estaremos presenciando um fenômeno que por algum mecanismo desconhecido até o momento, faz com que ocorra não só a degradação da matriz extracelular, mas também uma diminuição da expressão dos receptores adrenérgicos, especificamente os βAR, levando a uma regulação. Isso é prejudicial quando se fala em terapêutica, pois antagonistas precisam do receptor ancorado na membrana para poderem agir.

1.1. PROTEÓLISE

A complexidade do corpo humano necessita de muita sincronia para a regulação das funções fisiológicas. Uma forma de regulação de vários processos fisiológicos e patológicos já bem conhecida é a proteólise (THOLEN, 2013).

É a proteólise, que induz ativação e subsequente inativação de enzimas, o principal mecanismo de funcionamento, por exemplo, da coagulação (MACFARLANE, 1964; ADAMS; BIRD, 2009) e do sistema do complemento (NESARGIKAR; SPILLER; CHAVEZ, 2012; MERLE et al, 2015).

Enquanto o papel da proteólise na coagulação e no sistema complemento foi decifrado há várias décadas, o papel da proteólise em outros eventos fisiológicos e patológicos é investigado com muita dificuldade. Embora provado e aceito por muitos na comunidade científica (MEDZHITOV, 2008), o papel da proteólise na inflamação ainda tem muitas lacunas e provavelmente só será definido nas próximas décadas com o desenvolvimento de novos métodos capazes de detectar as modificações de peptídeos em extratos complexos (KLEIFELD et al, 2010;

PRUDOVA et al, 2010; KLEIFELD et al, 2011). O mesmo ocorre em outras áreas de estudo de doenças, que envolvem cascatas proteolíticas de difícil investigação.

Atualmente há muitas descrições do aumento de atividade proteolítica nos tecidos em geral com o envelhecimento e com várias doenças (GRUNE et al, 2001; HUSSAIN et al, 2017) e isso tem um grande potencial de modificar respostas fisiológicas de receptores proteicos.

Nas ultimas décadas o número de trabalhos destinados à compreensão dos mecanismos de proteólise tem aumentado, e não poderia ser diferente, com mais de 560 proteases humanas descritas desempenhando papéis importantes, tanto nos processos fisiológicos quanto patológicos (ECKHARD et al, 2016).

A primeira referência à degradação intracelular de proteína foi feita em 1942 por Schoenheimer, que através da marcação radioisotópica, revelou que as proteínas são constantemente sintetizadas e degradadas (SIMONI; HILL; VAUGHAN, 2002).

Simplificadamente a proteólise é a hidrólise das ligações peptídicas formadas por aminoácidos em uma proteína ou peptídeo, podendo formar a partir desta hidrólise um produto, ou seja, pequenos peptídeos ou aminoácidos isolados. O processamento proteolítico é uma modificação pós-traducional, que na maioria das vezes é irreversível e funciona como um regulador ubíquo da atividade celular (KING et al, 2018).

Grande parte da ciência da vida tem se concentrado em entender a complexa relação existente entre o genótipo e fenótipo e as novas tecnologias proporcionaram avanços neste sentido. Com o surgimento da “Era Genômica” foi possível abrir

portas para um “mundo novo” que trouxe consigo novos paradigmas. O termo *proteome* vem da junção das palavras inglesas: *PROTEin* + *genOME* e corresponde ao estudo do conjunto das proteínas de um organismo, um tecido ou célula (YAN et al, 1996). Embora o termo tenha sido determinado há muitos anos, a proteômica se tornou muito mais que um apêndice da genômica (DEUTSCH et al, 2016), possibilitando assim o estudo do conjunto de proteínas de um organismo e simultaneamente: sua catalogação, determinação de abundância, alterações dependente do genótipo e interação com outras proteínas (GYGI; AEBERSOLD, 2000; VALLEDORA; JORRÍN, 2011; SPEDA et al, 2017).

Essas novas ferramentas proporcionaram uma maior compreensão do mecanismo de interação das enzimas, uma das moléculas biológicas mais versáteis do organismo, e seus substratos (ULLA et al, 2018).

Notoriamente as enzimas possuem alta especificidade por seus substratos (HERSHKOZ et al, 1986), mas a capacidade de catalisar reações bioquímicas adicionais além das suas nativas tem mostrado um grande impacto nas pesquisas e revelado possíveis novos alvos terapêuticos (VERMA; PULICHERLA, 2016; COPLEY, 2017; UNTERLASS, et al 2017).

A elucidação da degradação dos substratos é essencial para entender as vias proteolíticas, e a degradômica, que é a abordagem da genômica associado à proteômica, revelou substratos provavelmente associados a novos papéis para as proteases *in vivo* (LÓPEZ-OTÍN; OVERALL, 2002; DEAN; OVERALL, 2007).

Muitas proteases foram descritas inicialmente com atuação extracelular, mas evidências crescentes sugerem que na verdade elas teriam um papel duplo nos microambientes extracelular e intracelular (RADISKY et al, 2009).

Novos métodos de investigação de proteases indicam que os substratos das MMPs são variadíssimos (PRUDOVA et al, 2010) apresentando desta forma novos caminhos investigativos e novos paradigmas.

1.2. FAMÍLIA DE PROTEASES

As proteases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases, que tem como função principal a hidrólise de ligações peptídicas na presença de moléculas de água (PARANTHAMAN; ALAGUSUNDARAM; INDHUMATHI, 2009).

Por serem fisiologicamente necessárias para a vida, as proteases são onipresentes, sendo encontrada em diversas fontes, tais como: animal, vegetal e microbiana (RAO et al., 1998; KASANA; SALWAN; YADAV, 2011;GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011).

A base de dados MEROPS *database* é um banco de dados onde é possível obter informações sobre proteases que estão organizadas em espécies, famílias e clãs. Seu foco é distinguir proteases através de sua especificidade, de acordo com a sequência que ela cliva. Segundo MEROPS *database* as sete classes principais desse modelo de classificação são: serino-proteases, metalo-proteases, aspartil-proteases, glutamil-proteases, cisteíno-proteases, asparagina-proteases e treonino-proteases. Foram descritas também mais duas famílias definidas como proteases com mecanismo catalítico desconhecido e misto (RAWLINGS; BARRET, 2018).

A seguir destacamos as características das quatro maiores famílias segundo este banco de dados.

1.2.1 SERINO PROTEASES

As serino proteases constituem a maior família, sendo encontradas em: vírus, procariotos e eucariotos (RANI; RANA; DATT, 2012;). As serinos proteases apresentam em seu sítio ativo o resíduo do aminoácido serina (S), onde a tríade catalítica clássica é composta por resíduos de Ser-His-Asp. Entretanto encontramos outros clãs formados por tríades distintas como as carboxil serino protease Asp-Glu-Ser e a Ser-His-His (POLGÁR, 2005). As serino proteases participam de vários processos fisiológicos importantes como: digestão, coagulação sanguínea, resposta imune e reprodução. A primeira serino protease que teve seu mecanismo de ação bem caracterizado foi a quimotripsina, por Bender e colaboradores em 1960.

1.2.2 ASPARTIL PROTEASES

Aspartil protease ou aspártico protease, comumente denominada como protease ácida (DASH et al, 2003) são as endopeptidases que possuem em seu sítio ativo resíduos de ácido aspártico (D), que está situado dentro do motivo Asp-Gly-Xaa, em que Xaa pode ser resíduo de serina (S) ou treonina (T). São agrupadas em três famílias: pepsina, retropepsina e as enzimas de pararetroviroses. Essas proteases são inibidas por pepstatina (RAO, 1998).

1.2.3 CISTEÍNO PROTEASES

Já a família das cisteíno proteases possui mais de 100 subfamílias descritas (RAWLINGS et al., 2018) e podem ser encontradas tanto em procariotos quanto eucariotos. A ação catalítica delas depende de uma díade catalítica consistindo de um resíduo de cisteína (C) e de um resíduo de histidina (H), tendo seu pH ótimo próximo ao neutro (RAO, 1998).

1.2.4 METALOPROTEASES

As metaloproteases são endo ou exopeptidases encontradas desde o filo Cnidário até Cordados. Como dito anteriormente elas pertencem à classe das hidrolases; nesta família o ataque nucleofílico é mediado por uma molécula de água e, diferente das outras famílias, elas necessitam da presença de um íon metálico divalente, geralmente zinco, mas algumas vezes cobalto, manganês, níquel ou cobre, para ativar a molécula de água. (RAWLINGS; BARRETT, 2013).

Podem ser divididas em dois amplos grupos dependendo do número de íons metálicos necessários para a catálise; em muitas somente o íon zinco é o suficiente; em outros casos é necessária a presença de dois íons metálicos agindo conjuntamente. Normalmente o resíduo de aminoácido no qual esses íons metálicos se ligam é His, Glu, Asp ou Lys, raramente ocorre a ligação em um resíduo de Cys. (RAWLINGS; BARRETT, 2013).

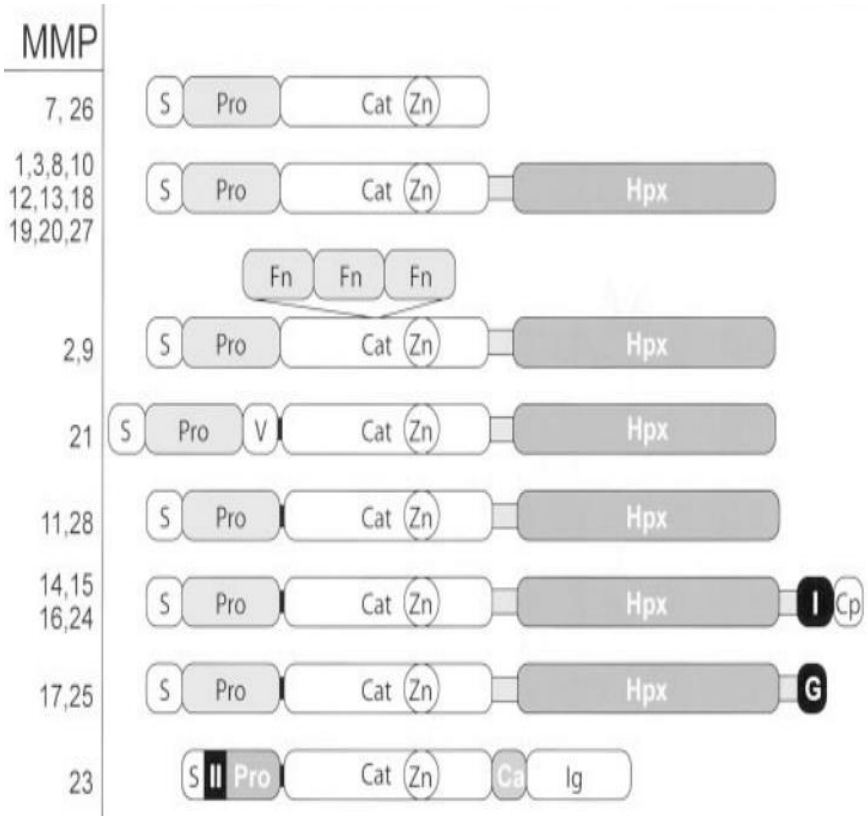
1.2.4.1 METALOPROTEASE DA MATRIZ

A família da metaloprotease da matriz (MMP) é um grupo de enzimas que degradam a matriz extracelular e precisam de dois íons de zinco para sua atividade e um íon de cálcio para manter sua estabilidade estrutural (TEZVERGIL-MUTLUAY et al, 2010). Essa família tem sido estudada de forma interdisciplinar com a contribuição de diversos campos do saber como, por exemplo: bioquímica, biologia celular, patologia, imunologia, fisiologia e biologia computacional e do ponto de vista de diferentes doenças: câncer, artrite, doenças periodontais e doenças cardiovasculares.

Segundo Osenkowski et al, (2004) para uma enzima ser classificada dentro da família MMP é necessário seguir alguns critérios como: hidrolisar ao menos um componente da matriz extracelular, possuir catálise dependente de zinco no sítio ativo, ser ativada por protease e organomercuriais, ser inibida por quelantes como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 1,10-phenantrolina ou um TIMP e possuir em seu cDNA uma sequência homologa a da MMP-1.

São agrupadas em clãs diferentes com base na natureza do resíduo de aminoácido que faz a ligação com o íon divalente no sítio ativo (RAO, 1998) podendo ser agrupadas em: colagenases, gelatinases, estromalisinas, matrilisinas, transmembrana (MT-MMP) entre outras (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006).

Figura 1. Organização dos domínios das MMPs: S= peptídeo sinal; Pro=pro-peptídeo; cat= domínio catalítico; Zn= sítio de ligação do zinco; Fn= domínio de fibronectina; Hpx= domínio hemopexina. Figura retirada de: VISSE, R., NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**. v. 92, p.827-839, 2003.



Muitos estudos foram realizados para conhecer o funcionamento destas enzimas, vários deles demostram que a habilidade das MMPs em degradar colágeno intersticial é apenas uma pequena amostra do que essas enzimas são capazes de hidrolisar (SOLOMONOV et al, 2016; ISAACSON et al, 2017).

Novos estudos mostram que não somente o colágeno, mas outros substratos podem ser degradados pelas MMPs (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2001; PRUDOVA et al, 2010).

As atividades das MMPs são moduladas por inibidores endógenos como a α2-macroglobulina e os inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs) (D´ARMIENTO, 2002).

A α2-macroglobulina são glicoproteínas capazes de inibir uma grande variedade de proteases, independentemente da especificidade e mecanismo catalítico. Agem em endopeptidases como as serino-proteases, cisteíno-proteases, aspártil-proteases e as metaloproteases (REHMAN; AHSAN; KHAN, 2013).

Os principais inibidores das metaloproteases e também os compostos que mais influenciam sua atividade são os TIMPs. Há quatro diferentes TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Estes inibidores proteicos são moléculas relativamente pequenas (cerca de 20kDa) e atuam formando um complexo de alta afinidade com uma estequiometria 1:1, onde a região N-terminal do TIMP interage com o domínio catalítico da MMP inibindo assim sua atividade. Já a porção C-terminal do TIMP se liga ao pro-domínio da MMP através do domínio hemopexina estabilizando o complexo TIMP/MMP (BREW; NAGASE, 2010).

Os TIMPs não possuem uma ação seletiva e geralmente inibem todas as MMPs conhecidas, mas a eficiência dessa inibição depende de cada par TIMP/MMP.

TIMP-1 inibe preferencialmente MMP-3, MMP-7 e MMP-9, tendo uma menor eficiência de inibição de MMP-14, 15,16,19 e 24. Já os TIMP-2, 3 e 4 podem atuar na MMP-2, mas o TIMP-4 tem uma maior afinidade pela MMP-2 e MMP-14 (RIETZ; SPIERS, 2012; ARPINO; BROCK; GILL, 2015).

1.2.4.2 METALOPROTEASE DA MATRIZ 2 (MMP-2)

Descrita e isolada inicialmente na década de 70 foi chamada de gelatinase A/ 72kDa colagenase tipo IV. Sendo sequenciada por Goldberg e colaboradores em 1988 e purificada de fibroblastos sinovial reumatoide humano, sendo caraterizada por Okada et al (1990).

Secretadas na forma de zimogênio (enzima inativa) são chamadas de pró-MMP quando estão nesta forma. A remoção proteolítica do pró-peptídeo perturba a interação do grupamento sulfidril (-SH) de uma cisteína “chave” na região PR**C**GVPD, região conservada nas MMPs, (BODE et al., 1994). Essa perturbação pode ser proteolítica ou por alterações conformacionais induzidas por detergentes, agentes oxidantes ou outro composto que competem com o Zn^{2+} pela ligação com o - SH como os compostos organomercuriais (WOESSNER, 1991). Esse modelo de ativação foi originalmente proposto como a hipótese do “*cysteine-switch*” (BIRKEDAL-HANSEN,1995; YAMAMOTO; MURPHY; TROEBERG, 2015).

Elas podem ser ativadas por clivagem proteolítica, que leva à perda do pró-peptídeo e consequentemente diminuição da massa molecular da protease. No

caso específico da MMP-2, sua ativação *in vivo* foi demonstrada na superfície de células em decorrência de outra metaloprotease, MMP-14 (STATON et al., 1998). A ativação da MMP-2 passa por uma etapa intermediária onde ocorre inicialmente a remoção de parte do pró-peptídeo, entre os resíduos 37 e 38, pela MMP-14, sendo removido depois todo o pró-peptídeo pela clivagem entre os resíduos de aminoácidos 80 e 81 (WOESSNER; NAGASE, 2000) é por esse motivo que em alguns tecidos detectamos o surgimento de MMP-2 com 3 massas diferentes, que são facilmente observadas em zimograma como 3 bandas de 72, 68 e 64kDa, enquanto que em outros tecidos conseguimos identificar apenas duas bandas, a da pró-enzima (72kDa) e da enzima ativa (64kDa).

Descrita primeiramente como uma enzima de atuação extracelular, evidências crescentes sugerem que a metaloprotease de matriz 2 (MMP-2) possa clivar alvos específicos intracelularmente como: a troponina I, cadeia leve da miosina 1, α-actina e a titina (SCHULZ, 2007; ALI; FAN; SCHULZ, 2011; HUGHES; SCHULZ, 2014). Dean e Overall (2007) relatam a descoberta de mais de 20 novos substratos para a MMP-2 e diversos trabalhos na literatura sugerem a relação desta enzima com doenças cardiovasculares (NETO-NEVES et al, 2013; HUGHES; SCHULZ, 2014; LU; AIKAWA, 2015).

1.3. DOENÇAS CARDIOVASCULARES

No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 1/3 dos óbitos registrados e dentre as principais enfermidades podemos destacar: infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral ou AVC e doença vascular periférica (RAZMARA et al, 2017). Os fatores de risco tradicionais para as doenças

cardiovasculares são: obesidade, diabetes, hipertensão e dislipidemia (SHARMA et.al., 2017; FOBIAN; ELLIOTT; LOUIE, 2018).

Do ponto de vista fisiopatológico, muitas doenças complexas são um conjunto de sinais e sintomas e não entidades absolutamente separáveis por uma causa bioquímica (KOTAS; MEDZHITOV, 2015). Inclusive, esta é uma razão por que muitas vezes diferentes tratamentos precisam ser testados até que clinicamente os sinais e sintomas sejam modificados, uma vez que diferentes causas bioquímicas explicam os diferentes sinais e sintomas.

Neste sentido, é interessante notar que, assim como no passado a descoberta do papel de proteases como a ECA e a renina no controle da pressão arterial foi importante para o desenvolvimento de classes de fármacos importantes para o controle da pressão arterial, hoje possivelmente outras proteases (cuja ação não foi caracterizada ainda) tenham papel importante na instalação e evolução de quadros de doenças cardiovasculares, e a inibição destas proteases poderia levar ao desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas.

Os alvos específicos deste aumento da proteólise nos tecidos aguarda o uso de ferramentas mais específicas para identificar possíveis substratos. Mas, enquanto se caminha na busca destas respostas (KLEIFELD et al, 2010), uma abordagem possível é testar hipóteses quanto ao possível papel que teria a proteólise por MMPs em sistemas fisiológicos específicos que estão alterados em doenças cardiovasculares, já que as respostas de agonistas em receptores destes sistemas está bem caracterizadas.

Essa abordagem usa também alguns dados da literatura que já testaram a proteólise específica de receptores importantes para o funcionamento do sistema

cardiovascular, embora nenhum destes trabalhos tenha uma resposta definitiva ou que seja considerada importante no contexto da fisiopatologia do sistema cardiovascular até o momento.

1.4. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G (GPCRs)

A maior família de receptores da superfície celular transmite sinais aos alvos intracelulares pela ação intermediária de proteínas que ligam o nucleotídeo guanidina, que são chamadas proteínas G. Mais de mil receptores acoplados a proteínas G foram identificados, incluindo um grande número de receptores para eicosanoides, vários neurotransmissores, neuropeptídeos e hormônios peptídicos. Além disso, a família de receptores acoplados a proteínas G inclui um grande número de receptores que são responsáveis pelo cheiro, visão e paladar (ROSENBAUM; RASMUSSEM; KOBILKA, 2009).

Os receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) são estruturalmente e funcionalmente relacionados e se caracterizam pela presença de 7 alfa-hélices que atravessam a membrana plasmática (7TM). Esse modelo foi apresentado por Dixon et al, (1987) e demonstra que cada uma das sete regiões hidrofóbicas atravessa a membrana formando três alças intracelulares e três alças extracelulares e a porção N-terminal do receptor é exposta no meio extracelular, enquanto sua porção C-terminal fica no citoplasma (NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006). Esses receptores compõem um sistema modular que permite a transmissão de sinais no organismo do meio extracelular para o meio intracelular.

A via de sinalização comum para os receptores GPCRs é iniciada com a ligação de um agonista específico que pode ser um: neurotransmissor, hormônio ou um fóton, no sítio de ligação do receptor na superfície da célula. Essa ligação causa

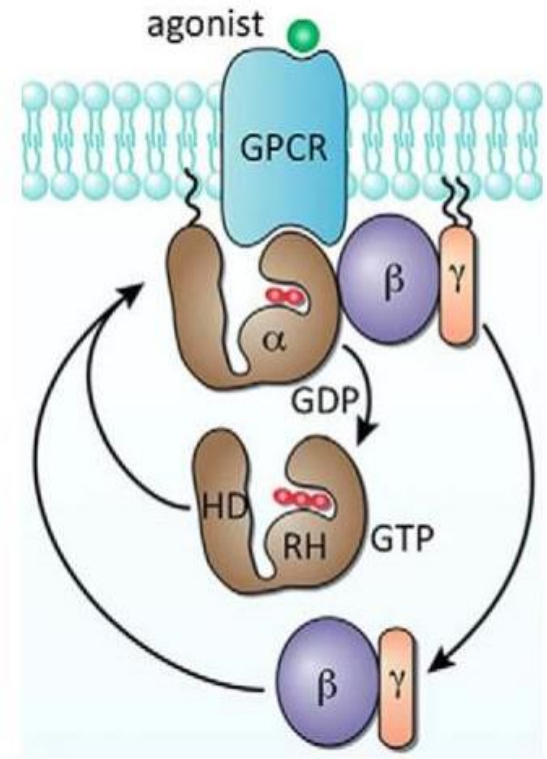
uma mudança na estrutura do receptor que permite sua interação com a proteína G na membrana celular formando assim um complexo de alta afinidade (STRADER et al., 1994).

Esta interação ativa a proteína G, que então se dissocia do receptor e leva o sinal ao alvo intracelular, que pode ser uma enzima ou um canal. A descoberta das proteínas G ocorreu quando estavam sendo feitos estudos de hormônios, como adrenalina, e se percebeu que isso estava associado ao aumento do AMP cíclico (AMPc) nas células alvo (COOPER; HAUSMAN; 2014, cap 13).

O AMPc é o principal mediador (segundo mensageiro) nas respostas celulares a vários tipos de hormônios, sendo este o mecanismo usual descrito para as células de músculo liso e cardíaco que serão mencionadas neste trabalho.

As proteínas G fazem parte de uma família de proteínas homólogas e triméricas, formadas de três subunidades, α, β e γ (NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006; MARTEMYANOV; GARCIA-MARCOS, 2018). O complexo receptor-proteína G catalisa a mudança do nucleotídeo guanina na subunidade α da proteína G levando a dissociação da proteína G nas subunidades α e βγ. A proteína G ligada ao GTP é a forma ativada que se dissocia do receptor e ativa as proteínas efetoras, modulando níveis intracelulares de segundos mensageiros e assim a transdução de sinais. A dissociação do complexo: proteína G/receptor faz com que diminua a afinidade do receptor pelo seu agonista. Foram identificadas 15 diferentes subunidades α, β e γ (STRADER et al., 1994). A Figura 2 apresenta o processo de ligação de um agonista ao receptor.

Figura 2. Representação da ativação de um GPCR: agonist = agonista; α,β,γ = unidades que compõem a proteína G; GDP = guanosina difosfato; GTP = guanosina trifosfato; HD = Domínio helicoidal; RH = domínio de homologia Ras. Adaptado de: Martemyanov, K.A., Garcia-Marcos, M. Making useful gadgets with miniaturized G proteins. **Journal of Biological Chemistry**. v. 293, p. 7474-7475, 2018.



A proteína G pode ter um papel estimulatório (Gs) ou inibitório (Gi) do sistema efetor, transmitindo os sinais para dentro da célula e causando uma série de modificações em cascata como: ativação de enzimas, abertura de canais iônicos etc, o que levará a uma resposta fisiológica ou patológica (ALBERTS et al., 2002).

Uma característica dos sistemas de sinalização intracelular consiste na adaptação a estímulos de longa duração por meio da dessensibilização. A regulação desses receptores pode acontecer por modificações pós-síntese e pode ser dividido quanto à duração (lento ou rápido), tipo (homólogo ou heterólogo) e mecanismo

envolvido (perda da função, redução do número ou regulação para baixo) (STROSBERG, 1993).

A modulação homóloga, de forma simplificada, envolve a fosforilação do receptor por quinases acopladas à proteína G que faz com que aumente a afinidade do receptor às moléculas de β-arrestina, impedindo a interação receptor/proteína G.

Isto acontece em todos os subtipos de receptores adrenérgicos que possuem um, ou às vezes, dois sítios consensus para a fosforilação através da rodopsina quinase ou rodopsina quinase β-adrenérgico (βARK), exceção do β_3AR.

Esta ligação ocorre na sequência Arg/Lys-Arg-X onde X pode ser Ser/Thr no *loop* 3 ou no domínio carboxi-terminal próximo ao sítio de ligação da proteína G.

Já a modulação heteróloga envolve a fosforilação do receptor pela enzima PKA ou qualquer estímulo que aumente a concentração intracelular de AMPc, induzindo assim a dessensibilização do receptor. No receptor β_1AR e β_2AR a fosforilação através da PKA leva a uma regulação para baixo nos níveis de mRNA desses receptores (SUMMERS; KOMPA; ROBERTS, 1997).

A superfamília dos GPCRs é dividida em seis famílias principais que compartilham pouca homologia de sequência entre os membros de diferentes famílias e algum tipo de similaridade funcional. Apesar de apresentarem a mesma estrutura hepta-helicoidal diferem quanto ao tamanho do domínio N-terminal, a localização do domínio onde ocorre a ligação do agonista e o próprio agonista (TUTEJA, 2009; GUREVICH;GUREVICH, 2018).

Dentre essas famílias, iremos destacar três, sendo a primeira destacada a mais importante para o nosso trabalho:

- Família da rodopsina: constitui o maior grupo dentre os GPCRs, neles encontramos pequenos ligantes e receptores odorantes. Esta família se subdivide em 3 grupos do qual o grupo 1 abrange os receptores para pequenos ligantes onde encontramos a rodopsina e os receptores β-AR. O grupo 2 encontramos receptores para peptídeos e no grupo 3 ligantes para hormônios glicoproteicos.

- Família da secretina: Essa família é caracterizada pela presença de um grande domínio N-terminal. Apesar de apresentar similaridade morfológica com o grupo 3 da família anterior, os membros dessa família não compartilham nenhuma sequência homologa. Seus ligantes incluem hormônios como: glucagon, secretina, calcitonina entre outros.

- Família dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR): menor família dos GPCRs compreende os mGluR e os receptores sensíveis a Ca^{2+} . Nesta família também encontramos os receptores GABA-B, receptores gustativos e os olfatórios, assim como a família anterior, apresentam um grande domínio N-terminal.

Como se pode perceber, grande parte das respostas fisiológicas dos vertebrados está baseada na transdução do sinal de GPCRs, uma vez que estes receptores fazem a ponte de comunicação entre o meio extracelular e intracelular das células. O papel clássico dos GPCRs é acoplar a ligação do agonista à ativação de proteínas G heterotriméricas, levando à modulação de proteínas efetoras e modificação de função. Entretanto, atualmente há um grande número de estudos mostrando que os GPCRs tem sinalização mais complexa, com respostas variadas que levaram muitos autores a propor diferentes classes de "eficiência de ligante" para esta classe de receptores (ROSENBAUM; RASMUSSEN, KOBILKA, 2009). Apesar de todas as informações a respeito desta família de receptores, conforme

dito por Rosenbaum et al. (2009) "a questão fundamental sobre o mecanismo que explica a ligação do ligante ao GPCR ativado se mantém: como ligação de um agonista e as resultantes modificações nas interações do ligante no bolsão de ligação levam a modificações conformacionais que são propagadas da porção extracelular da molécula para a superfície citoplasmática envolvida na ligação com a proteína G." Neste sentido, em anos recentes houve muitas publicações em revistas de alto impacto a respeito de descobertas recentes sobre a conformação da porção extracelular dos receptores desta família de GPCRs (da família da rodopsina), em particular do β_1AR e do β_2A. A porção N-terminal extracelular e outros domínios extracelulares dos β_1AR e β_2AR contêm uma alfa hélice curta que é estabilizada por ligações dissulfeto intra- e "interloop" (WARNE et al, 2011; BANG; CHOI, 2015). A preocupação com a compreensão das alterações conformacionais (e sua estabilização) da porção extracelular destes receptores é muito grande entre os pesquisadores que estudam a ativação e inativação desta classe de receptores (BOUVIER, 2013).

1.4.1 RECEPTOR B1-ADRENÉRGICO (B1-AR)

Os β-ARs são os receptores alvo das catecolaminas, principalmente adrenalina e noradrenalina, e várias células do corpo possuem estes receptores, que são estimulados por estes hormônios, levando à ativação do sistema nervosos simpático na resposta clássica ao estímulo de "correr ou lutar" (DE LUCIA et al, 2014).

Há uma grande concentração de β-ARs no coração, aproximadamente 75-80% são β1-AR do total de β-ARs, sendo essa porcentagem variável em doenças

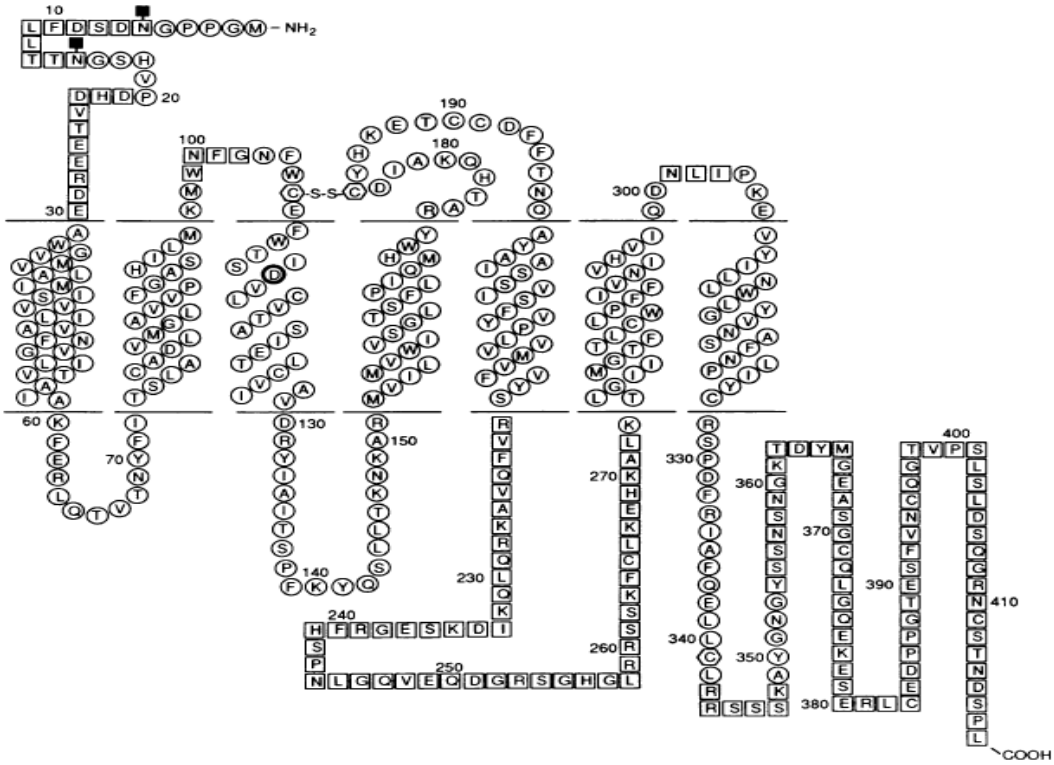
cardíacas (ROCKMAN; KOCH; LEFKOWITZ, 2002). Após a ativação dos receptores beta 1 há aumento do cAMP, ativação da proteína quinase A (PKA), que irá fosforilar várias proteínas dos cardiomiócitos, desencadeando a sua contração (RATHZ et al, 2002; ROCKMAN; KOCH; LEFKOWITZ, 2002).

Assim, os receptores β1-AR atuam no inotropismo positivo e cronotropismo, sendo importantes alvos para os antagonistas β-ARs, que são fármacos amplamente usados no tratamento de doenças cardiovasculares (OSHIMA et al, 2014). Sob estresse cardíaco há uma desregulação e um desacoplamento da via de ativação do receptor β1-AR. A super expressão deste receptor resulta em atrofia cardíaca, aumento da apoptose e eventualmente insuficiência cardíaca (STANSFIELD et al, 2014).

A família dos β-ARs (β1, β2 e β3) possuem polimorfismos associados à incidência de insuficiência cardíaca severa. Foram descritos 12 polimorfismos para o β1-AR do tipo SNP (single nucleotide polimorphism), troca de um único par de base, dentre os quais 8 acarretam na mudança de aminoácido. Uma troca importante ocorre no aminoácido da posição 49 da região N-terminal denominada Ser49Gly (NASCIMENTO et al, 2012). A mudança nessa posição pode alternar a conformação das porções transmembrana e intracitoplasmática do receptor, influenciando o processo de sinalização dos neurotransmissores e sua regulação (PEREIRA et al, 2010).

A Figura 3 monstra o esquema de β-AR de hamster na membrana plasmática como exemplo:

Figura 3. Modelo de distribuição do β-AR na membrana plasmática. Figura retirada de: Dixon, R.A.F., Sigall, I.S., Candelore, M.R., Registerl, R.B., Scattergood, W., Rands, E., Strader, C.D. Structural features required for ligand binding to the ,β-adrenergic receptor. **The EMBO Journal,** v.6 no.11 p.3269-3275, 1987.



Communal et al, (2003) sugeriram que a estimulação de receptores β-adrenérgicos (β-AR) induz apoptose em miócitos ventriculares de ratos adultos (ARVMs), essa estimulação leva a um aumento da expressão e da atividade da MMP-2 e a inibição dessa atividade levaria a inibição do receptor produzindo um efeito proapoptótico (MENON et al, 2006). As MMPs são expressas em baixos níveis em um miocárdio normal, mas são muito expressas quando há insuficiência cardíaca. Com o uso de modelos animais para essa patologia é possível demonstrar uma relação entre o mecanismo de expressão das MMPs e o processo de remodelamento do ventrículo esquerdo (SPINALE, 2002). Em outro trabalho os autores relatam que neurotransmissores como norepinefrina, endotelina e a

angiotensina II aumentam a síntese de certas espécies de MMPs em isolados de miócitos de ventrículo esquerdo (COKER et al., 2001).

Wang et al, (2012) relatam que o sinal dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs), se deve em parte as MMPs e as “proteína desintegrina e metaloprotease” (ADAMs) e também que elas estariam envolvidas na modulação do tônus vascular bem como na transcrição e tradução de múltiplos genes a jusante dos GPCRs. Os autores concluem que as MMPs emergem como mediadores de muitos agonistas de GPCRs e desta forma essas enzimas seriam fortes candidatos como alvos terapêuticos no tratamento da hipertensão e doenças cardíacas complexas ou com etiologia desconhecida.

Hakalahti et al, (2010) observaram que a regulação dos β-ARs passa por mecanismos diferentes entre si. Além disso, o β1-AR humano (h β1-AR) está sujeito à ação de proteólise nos aminoácidos Arg31↓Leu32 e Pro52↓Leu53 presentes na região N-terminal, sendo essa proteólise constitutiva *in vivo* e mediada por metaloprotease, e mais importante, a proteólise na região Arg31↓Leu32 é aumentada quando o receptor é ativado por um agonista. A clivagem da região N-terminal de β1-AR mediada por metaloprotease foi descrita pela primeira vez em células de eritrócitos de peru (Jürss et al, apud HAKALAHTI et al., 2010)[1]. Neste estudo de 2010 Hakalahti e colaboradores também demonstraram N- e O-glicosilações, e que a presença destas glicosilações impedem a proteólise, sugerindo que o grau de glicosilação possa ser uma forma de proteção contra a proteólise.

[1] JŸRSS, R., HEKMAN, M., HELMREICH, E,J. Proteolysis-associated deglycosylation of beta 1-adrenergic receptor in turkey erythrocytes and membranes. Biochemistry. v. 24, nº13, p. 3349-3354, 1985.

Em estudo em animais Ferraz et al, (2012) testaram os efeitos da administração intravenosa de MMP-2 recombinante em carneiros sob condições basais e durante a estimulação do coração com agonista β1-AR , dobutamina.

Foram usados 26 carneiros machos anestesiados em 2 protocolos de estudo. No primeiro estudo foi injetada a MMP-2 recombinante (intravenosa por 60 minutos) na concentração de 220 ng/Kg/min ou o veículo, não sendo encontradas quaisquer alterações hemodinâminas. No segundo protocolo foi infundida dobutamina (agonista β1-AR) ou salina ao longo de 3 horas. Um grupo de animais haviam recebido doxiciclina antes da infusão de MMP-2. Os resultados mostram que a dobutamina, conforme esperado, diminuiu o índice de resistência vascular sistêmica, efeito que foi atenuado pela MMP-2 recombinante. A dobutamina aumentou o índice cardíaco e a dP/dT (máxima) ventricular esquerda, efeitos que foram atenuados pela MMP-2. A administração prévia de doxiciclina fez com que desaparecessem os efeitos da MMP-2 recombinante. Os resultados mostram que o aumento circulante da MMP-2 está associado à redução da resposta hemodinâmica do β1-AR no modelo animal testado.

Diante desses fatos e pela importância do β1-AR em termos fisiológicos e farmacológicos, este trabalho objetivou estudar os efeitos da proteólise deste receptor pela ação da rhMMP-2 *in vitro*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Analisar a proteólise do receptor β1-adrenérgico pela rhMMP-2 e a expressão deste receptor em cultura de cardiomiócitos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1- Analisar a sequência do receptor β-1 adrenérgico *in sílico*: de rato, de camundongo e humano; comparando-as quanto ao grau de conservação.

2- Verificar *in sílico* utilizando o programa Cleavpredict se a porção extracelular do domínio N-terminal do receptor β-1 adrenérgico (rato, camundongo e humano) possui sítios prováveis de clivagem pela rhMMP-2.

3- Comparar a sequência da porção N-terminal do receptor β-1 adrenérgico com a sequência de substratos da MMP-2.

4- Desenhar peptídeos que correspondam à região extracelular do receptor β-1 adrenérgico, especificamente a região N-terminal. E incubar com rhMMP-2 para verificar as sequências de clivagem por proteólise *in vitro*.

5- Avaliar a integridade do receptor β1-adrenérgico em cardiomiócitos de ratos neonatos em cultura, após a estimulação do agonista do receptor β1-adrenérgico, dobutamina, em células previamente incubadas ou não, com rhMMP-2 e doxiciclina e ONO-4817.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. rhMMP-2

A enzima utilizada nos experimentos foi produzida em nosso laboratório segundo protocolo de Gonçalves et al, (2012) e parte foi adquirida da ABCAM ® (ab174022) (Cambridge, MA, USA). A enzima comercial foi ressuspendida conforme orientação do fabricante.

3.2. ESTUDO *IN SÍLICO* DO RECEPTOR B-1 ADRENÉRGICO

O receptor β1-adrenérgico foi analisado em toda a sua extensão em sua forma nativa utilizando a plataforma *CLEAVPREDICT*©. O objetivo desta análise foi encontrar possíveis sítios de clivagem onde a rhMMP-2 pudesse atuar.

3.3 . SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS COM BASE NOS PROVÁVEIS SÍTIOS DE CLIVAGEM

Com base nos resultados do estudo *in sílico* foram desenhados e sintetizados peptídeos para o ensaio enzimático *in vitro*:

ASPPASLLPPAS (1107,28 Da)

PPASEGSAPLSQ (1140,22Da)

ASEGSAPLSQWG (1189,26Da)

Os peptídeos foram sintetizados pela empresa Biomatik® (Wilminghton, Delaware, USA). Eles foram ressuspendidos conforme recomendação do fabricante e após esse procedimento foi realizado ensaio enzimático *in vitro*, onde os peptídeos e seus respectivos controles foram incubados na concentração de 0,02µg/µL com a rhMMP-2 na concentração de 0,5 µg/µL, a 37°C por 1h. As amostras foram então passadas em uma coluna C18 (EMPORE^{TM} –3M) para realizar a retirada de sal

segundo protocolo de Rappsilber e colaboradores (2007), em seguida foram liofilizadas para posterior análise.

O produto da hidrólise foi sequênciado por massa intacta em espectrômetro de massas modelo QTof Premier acoplado a um cromatógrafo líquido, modelo nanoAcquity ambos da Waters® (Milford, Massachustts, EUA).

Após análise dos resultados foi desenhado e sintetizados mais três novos peptídeos utilizando apenas o trecho que houve a hidrólise: MGAGALALGASE (1047,2Da); ASEPCNLSSAAPLPDGA (1599,74Da); GAATAARLLVLA (1126,37 Da). Novamente realizamos o ensaio *in vitro* como descrito anteriormente e as amostras da hidrólise foram encaminhadas novamente para análise de massa intacta.

3.4. CULTURA PRIMÁRIA DE CARDIOMIÓCITOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA-FORP) (nº 2014.1.1164.58.4.). O procedimento para eutanasiar o animal foi por meio de decapitação (Yu et al, 2013; Reinecke et al, 2009; Sakurai et, 2014; Tseng et al 2001). Segundo Sakurai e colaboradores (2014) para recolher rapidamente as amostras a decapitação é o método mais rápido e eficiente. O protocolo de cultura primária de cardiomiócitos foi realizado com coração de ratos *Wistar* neonatos, 1 dia de vida. Os corações foram excisados e os ventrículos foram separados e transferidos para uma placa de petri contendo tampão ADS 1x (NaCl 0,1M, KCL 5,4mM, $MgSO_4$ 0,8mM, D-glucose 0,1%, NaH_2PO_4. H_2O 0,8Mm e HEPES 20mM). Os ventrículos foram então excisados e submetidos a 6-7 digestões enzimáticas com colagenase 2 (Worthington, USA), cada digestão teve duração de 12 minutos e foi realizada a 37ºC sob agitação. A solução obtida em cada digestão foi transferida para um tubo contendo 1mL de

Newborn Calf Serum (NCS) (Gibco 16010-159), sendo centrifugada a 340x*g* por 5 minutos a 4°C, o precipitado foi ressuspendidos em NCS. Para a separação dos cardiomiócitos das demais células da suspensão, a solução foi transferida para um tubo contendo gradiente de *Percoll* (9 partes de *Percoll* para 1 parte de ADS 10x). A partir desta solução foi feita uma solução de baixa densidade (*Top*) para retirada de fibroblastos e uma de alta densidade (*Bottom*) para separação dos cardiomiócitos. Na solução *Bottom* foi adicionado phenol red (Sigma P3532). Para a formação do gradiente essa suspensão foi centrifugada a 340x*g* por 30 minutos a 4°C, sem desaceleração. As células presentes na fase média formaram uma "nuvem branca" e foram aspiradas cuidadosamente e centrifugadas novamente a 340x*g* por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspendido em meio DMEM contendo 5% de NCS e 10% de HS (Horse Serum) (Gibco 26050-088), essa solução foi plaqueada em placas de 6 poços na densidade de $6x10^5$ células/poço e mantidas em estufa a 37ºC com saturação de CO_2 em 5% por 3 a 5 dias com troca de meio a cada 48 horas.

3.5. DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RECEPTOR BETA 1 ADRENÉRGICO POR *WESTERN BLOTTING*

Para a determinação da integridade do receptor beta 1 adrenérgico por Western Blotting, as células foram estimuladas ou não com rhMMP-2 na presença e ausência de inibidores, sendo feito o estímulo do agonista. As culturas primárias de cardiomiócitos foram plaqueadas até a confluência de 80%, uma vez atingido este valor o meio de cultura foi substituído por DMEM livre de soro e ficaram nesta condição por 1 hora. Após este período as culturas foram pré-tratadas com doxiciclina ou ONO-4817 a 10µM e o controle foi tratado com veículo, durante 30 minutos. Em metade das amostras foi feita a incubação concomitantemente com rhMMP-2, na concentração de 40 nM e 120nM por 1 hora. Após este período as

células foram estimuladas com doubutamina na concentração de 10µM por 15 minutos, valor já pré-estabelecido por Ferraz (2013). Após o tratamento o meio foi retirado e os cardiomiócitos foram incubados com HCl 0,1M por 20 minutos para lisar as células. Com auxilio de um “rodinho” as células foram desprendidas da placa e a suspensão celular foi centrifugada a 1000x*g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para avaliação das concentrações de AMPc por imunoensaio enzimático utilizando o *kit* Cyclic AMP EIA (581001, Cayman Chemical, USA) (dados não mostrados neste trabalho).

A seguir foram acrescentados 100 uL de tampão RIPA (ThermoFisher-89900) por amostra. O tampão RIPA continha inibidores enzimáticos de metalo-proteases, serino-proteases e cisteíno-proteases (os inibidores foram acrescentados imediatamente antes da adição do tampão às amostras na concentração de 1 mM cada). O extrato foi então sonicado em gelo. As amostras foram colocadas no gelo por 15 minutos. A seguir foi realizada centrifugação das amostras por 15 minutos a 12000x*g* a 4°C.

Para a determinação de proteína total foi utilizando o método de Bradford. Quarenta microgramas de cada amostra foram aplicados por canaleta de gel. Após a corrida dos géis de poliacrilamida, foi feita a transferência das proteínas para as membranas utilizando tampão de transferência (Tris 48mM; glicina 39 mM; metanol 0,2% e SDS 10%). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h em TBS-T + BSA 5% para o bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida foi adicionado o anticorpo primário anti receptor beta 1 adrenérgico (PA5-18482, Invitrogen, USA) diluído previamente em TBS-T + BSA na diluição recomendada pelo fabricante, sendo em seguida incubada overnight a 4ºC sob leve agitação. Após esse período a

membrana foi lavada 3 vezes durante 5 minutos cada com TBS-T sem BSA e em seguida incubada com o anticorpo secundário diluído previamente em TBS-T sem BSA, a membrana ficou nesta solução por 1 hora a 4ºC sob leve agitação. Após este período foi repetido o procedimento de lavagem anteriormente descrito e em seguida a membrana foi revelada com o kit do ECL (Millipore). As membranas passaram pelo processo de "stripping" e foram incubadas com o anticorpo primário anti beta-actina (Millipore) por 45 minutos a temperatura ambiente. A intensidade das bandas foi capturada no sistema ChemiDoc (BioRad) e a quantificação foi feita utilizando-se o programa Image J (NIH).

3.6. ENSAIO FLUORIMÉTRICO

Utilizando um substrato fluorimétrico MCA-PLGL-Dpa-AR-NH2 (R&D-ES001) foi realizado o ensaio para testar a atividade enzimática da rhMMP-2. O substrato foi aliquotado conforme recomendação do fabricante. Para o ensaio foi utilizado 5uL do substrato diluído em tampão Tris- $CaCl_2$ a 50mM (50mM de Tris-HCl + 10 mM de $CaCl_2$, pH=7,4). Utilizando placa de elisa preta opaca acrescentamos 5uL de substrato previamente diluído + tampão Tris- $CaCl_2$ +rhMMP-2 na concentração final 10mM, como controle positivo foi utilizado uma colagenase de *Clostridium hystoliticum.* O ensaio foi realizado utilizando o programa SoftMax® Pro5. Para a excitação utilizamos o comprimento de onda 320 nm e emissão 405nm.

3.7. ANALÍSE ESTATÍSTICA

Os dados bioquímicos foram analisados por ANOVA de 1 via seguida pelo teste post hoc Tukey. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (Erro Padrão da

Média) e um valor de probabilidade menor que 0,05 foi considerado o nível mínimo de significância estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando os dados apresentados por Prudova e colaboradores (2010) onde mapearam os possíveis aminoácidos clivados pela MMP-2 em autólise e suas frequências nas posições P4-P4´, realizamos um estudo *in sílico* do receptor *β1-AR* de *Rattus norvergicus*, *Mus musculus* e *Homo Sapiens* para detectar possíveis pontos de clivagem pela rhMMP-2 neste receptor. Para tanto fizemos um alinhamento da sequência de aminoácidos do receptor β1-AR de *Rattus norvergicus* (Rn) x *Mus musculus* (Mm) e *Rattus norvergicus* x *Homo sapiens* (Hs) utilizando a plataforma BLASTp suíte 2-sequences (NCBI).

Figura 4. Alinhamento da sequência de aminoácidos do receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* (Rn) e *Mus musculus*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa *Bioedit* (http://www.citeulike.org/user/echinotrix/article/691774). Os pontos correspondem aos resíduos de aminoácidos iguais.

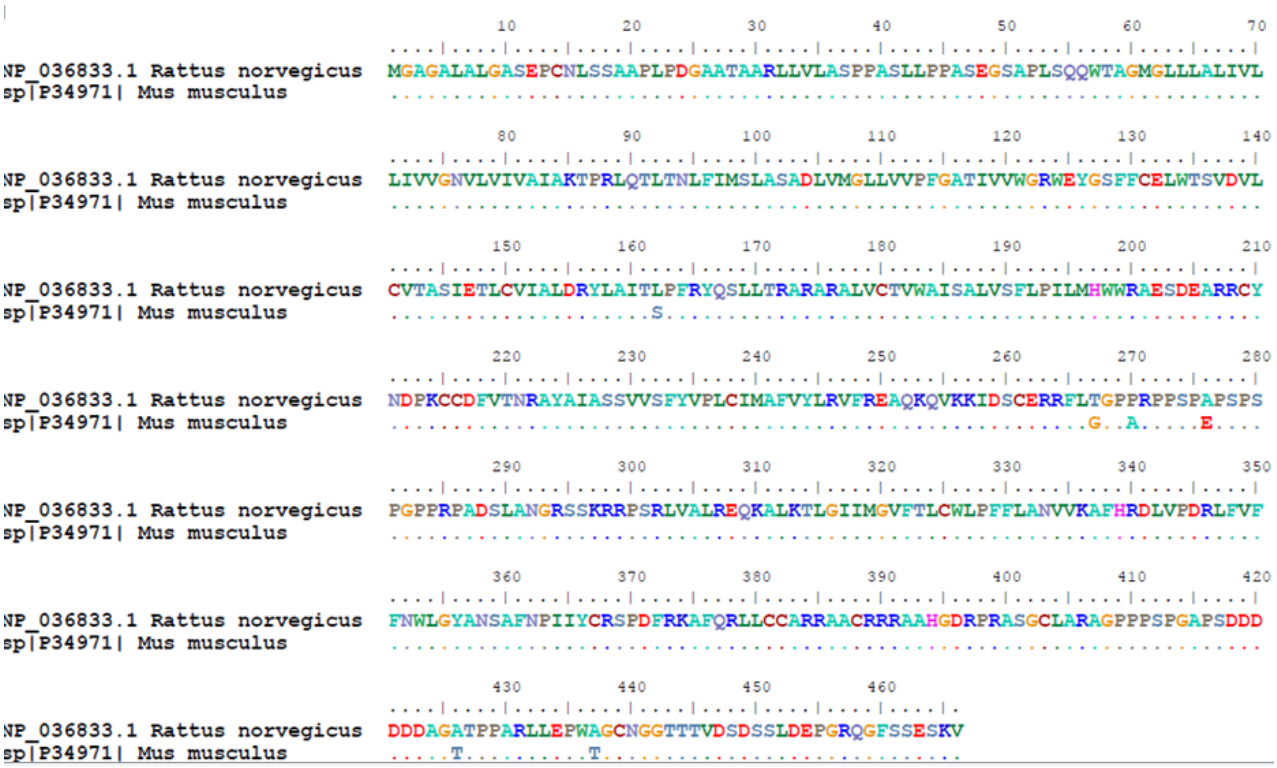


Figura 5. Alinhamento da sequência de aminoácidos do receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* (Rn) e Homo sapiens. O alinhamento foi realizado utilizando o programa *Bioedit* (http://www.citeulike.org/user/echinotrix/article/691774). Os pontos correspondem aos resíduos de aminoácidos iguais.

```
                                    10        20        30        40        50        60        70
                            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NP_036833.1 Rattus norvegicus MGAGALALGASEPCNLSSAAPLPDGAATAARLLVLASPPASLLPPASEGSAPLSQQWTAGMGLLLALIVL
NP_000675.1 Homo sapiens      ....V.V......G....................P.............SPE.............M.....

                                    80        90       100       110       120       130       140
                            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NP_036833.1 Rattus norvegicus LIVVGNVLVIVAIAKTPRLQTLTNLFIMSLASADLVMGLLVVPFGATIVVWGRWEYGSFFCELWTSVDVL
NP_000675.1 Homo sapiens      ...A..............................................................

                                   150       160       170       180       190       200       210
                            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NP_036833.1 Rattus norvegicus CVTASIETLCVIALDRYLAITLPFRYQSLLTRARARALVCTVWAISALVSFLPILMHWWRAESDEARRCY
NP_000675.1 Homo sapiens      ......................S..............G................................

                                   220       230       240       250       260       270       280
                            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NP_036833.1 Rattus norvegicus NDPKCCDFVTNRAYAIASSVVSFYVPLCIMAFVYLRVFREAQKQVKKIDSCERRFLTGPPRPPS------
NP_000675.1 Homo sapiens      ..........................................................G..A....PSPSPV

                                   290       300       310       320       330       340       350
                            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NP_036833.1 Rattus norvegicus PAPSPSPGPPRPADS-----LANGRSSKRRPSRLVALREQKALKTLGIIMGVFTLCWLPFFLANVVKAFH
NP_000675.1 Homo sapiens      ...A.P.......AAAATAP.....AG.......................................

                                   360       370       380       390       400       410       420
                            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
NP_036833.1 Rattus norvegicus RDLVPDRLFVFFNWLGYANSAFNPIIYCRSPDFRKAFQRLLCCARRAACRRRAAHGDRPRASGCLARAGP
NP_000675.1 Homo sapiens      .E....................................G.........R..H.T.............P..

                                   430       440       450       460       470
                            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
NP_036833.1 Rattus norvegicus PPSPGAPSDDDDDD-AGATPPARLLEPWAGCNGGTTTVDSDSSLDEPGRQGFSSESKV
NP_000675.1 Homo sapiens      ......A.......VV..................-AAA.........C.P..A.....
```

De acordo com o alinhamento notamos que a identidade do β1-AR entre as espécies *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* é de 98% e entre *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens* é de 88%. Quando analisamos a região N-terminal, região de nosso interesse, observamos uma identidade de 100% para *Rattus norvegicus* e *Mus musculus,* o que não corre com a espécie *Homo sapiens*.

Utilizando outra plataforma, CLEAVPREDICT, simulamos uma clivagem na região N-terminal do β1-AR utilizando a MMP-2 como enzima para as três espécies citadas (http://cleavpredict.sanfordburnham.org/) e observamos o seguinte resultado:

Figura 6. Clivagem *in sílico* do receptor β1AR de *Rattus norvegicus, Mus musculus* e *Homo sapiens* realizada utilizando a plataforma CLEVPREDICT. Os resíduos de aminoácidos em vermelho são os possíveis pontos de clivagem e os resíduos em verde correspondem a regiões onde ocorrem polimorfismos de base única (SNP).

β1Rn e β1Mm

M G A G A L A L G A S E P C N L S S A A P L P D G A A T A A R L L V L A S P P A S L L P P A S E G S A P L S Q

β1Hs

M G A G V L V L G A S E P G N L S S A A P L P D G A A T A A R L L V P A S P P A S L L P P A S E S P E P L S Q

A clivagem realizada *in sílico* mostrou que para os receptores de *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* a clivagem ocorre no sítio P1, posições 15, 31, 32 e 41 produzindo os respectivos resíduos; SEPCN-LSSAA, ATAAR-LLVLA, TAARL-LVLAS e SPPAS-LLPPA, para o receptor de *Homo sapiens* a clivagem também ocorre no sítio P1, nas posições 15, 31, 32, 41 e 47 produzindo os respectivos resíduos SEPGN-LSSAA, ATAAR-LLVPA, TAARL-LVPAS, LPPAS-ESPEP. A sequência FASTA apresentada pelo programa CLEAVPREDICT além de identificar os possíveis sítios de clivagem, aminoácidos em vermelho, também fornece os sítios de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) aminoácidos em verde. Polimorfismo de nucleotídeo único ocorre quando uma base nitrogenada localizada no DNA de cromossomos homólogos é trocada, isto ocorre em 1% da população.

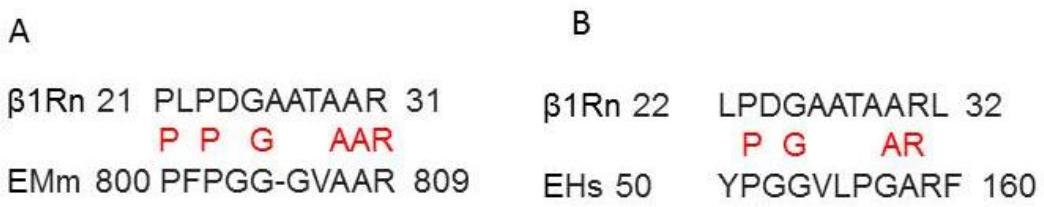
A presença de polimorfismos podem acarretar modificações no produto final dos genes (LATHTI et al 2012), levando a algumas alterações e implicações funcionais diferenciadas que podem ou não estar associadas a uma condição patológica.

A presença de SNP do tipo Ser39Gly (PEREIRA et al, 2010) no β1-AR de *Homo sapiens* não impede que ocorra a clivagem da ligação nesta região segundo a clivagem *in sílico* do CLEAVPREDICT.

Classicamente a MMP-2 cliva colágeno nativo do tipo IV e V (OKADA, et al 1990) e tem uma alta afinidade por colágeno desnaturado (gelatina) e fibronectina (BERGMANN, et al 1995), além de elastina, laminina 1 e 5 e agrecana (BARRET;WOESSNER; RAWLLINGS, 2004).

Desta forma realizamos um estudo *in sílico* da região N-terminal do receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* com substratos conhecidos da MMP-2 para ver sua identidade. Primeiro fizemos o alinhamento com a sequência da elastina e observamos uma identidade de 55% entre a região N-terminal do receptor e essa glicoproteína em *Mus muscullus* e de 36% de identidade em *Homo sapiens* como mostrado na figura abaixo.

Figura 7. Alinhamento *in sílico* do receptor β1AR e a glicoproteína elastina realizada utilizando a plataforma BLASTp suíte 2-sequences (NCBI). Os resíduos de aminoácidos em vermelho correspondem a sequência consensus. Em (A) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e elastina de *Mus muscullus* ; (B) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e elastina *Homo sapiens*.



Para o substrato agrecana essa relação ficou em 30% e 55% quando a comparação é *Rattus norvegicus* x *Mus muscullus* e para *Homo sapiens* 31% de identidade.

Figura 8. Alinhamento *in sílico* do receptor β1AR e a proteína agrecana realizada utilizando a plataforma BLASTp suíte 2-sequences (NCBI). Os resíduos de aminoácidos em vermelho correspondem a sequência consensus. Em (A) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e agrecana de *Mus muscullus* ; (B) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e agrecana *Homo sapiens*.

```
A

β1Rn  3     AGALALGASEPCNLSSAAP-----LPDGAATAARLLVLASPPASLLPPAS  47
            +GAL   G    P    L  S         P  G +         + S  P+S  LP   S
AgMm  1220  SGALDFGKLPPGTLGSGQTPEVNGFPSGFSGEYSGADIGSGPSSGLPDFS  1269

β1Rn  44  PPASEGSAPLS  54
          P     EGS  P  S
AgMm  692  PGEEEGSTPTS  702

B

β1Rn  5     ALALGASEPCNLSSAAPLPDGAATAA  30
             + LG+    P    L     +  LP  G    T +
AgHs  1520 GVDLGSGPPSGLPDFSGLPSGFPTVS  1545
```

As lamininas são glicoproteínas com funções comuns e específicas e possuem diversas isoformas (AUMAILLEY, 2013) utilizando UniProtKB realizamos o alinhamento da laminina 1, subunidades α,β e γ e obtemos os seguintes resultados:

Figura 9. Alinhamento *in sílico* do receptor β1AR e a proteína laminina 1 realizada utilizando a plataforma BLASTp suíte 2-sequences (NCBI). Os resíduos de aminoácidos em vermelho correspondem a sequência consensus. Em (A) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e laminina 1 de *Mus muscullus* ; (B) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e laminina *Homo sapiens*.

```
β1Rn   12   EPCNLSSAAPLPDGAA  27
            PCN   S A   +  DG
Lα1Hs  949  RPCNCSVAGSVSDGCT  964

β1Rn 15     NLSSAAPLPDG  25
            NL+     P+P   G
Lα1Hs  1579  NLTGIIPVPYG  1589

β1Rn  20     APLPDG  25
             P  PDG
Lβ1Mm/Hs  917  CPCPDG  922

β1Rn 6      LALGASEPCN  15
             A+G      CN
LγMm/Hs  1 278  FAVGGRCKCN  287
```

Para as subunidades αMm obtivemos 42% e 45% de identidade respectivamente e para αHs a relação ficou em 44% e 45%. Já para as subunidades β e γ obtivemos porcentagens iguais tanto para Mm quanto para Hs, sendo 67% subunidade β e 40% para a subunidade γ.

O ultimo substrato analisado foi o colágeno tipo IV. O colágeno é a maior classe de proteínas fibrosas insolúveis encontradas na matriz extracelular dos organismos e existem diversos tipos. Ela é constituída por três cadeias polipeptídicas chamadas alfa. Analisamos a identidade do colágeno tipo IV alfa 1 tanto de Mm quanto Hs e obtivemos 33% e 30% de identidade, respectivamente.

Figura 10. Alinhamento *in sílico* do receptor β1AR e colágeno IV α1 realizada utilizando a plataforma BLASTp suíte 2-sequences (NCBI). Os resíduos de aminoácidos em vermelho correspondem a sequência consensus. Em (A) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e colágeno IV de *Mus muscullus* ; (B) receptor β1-AR de *Rattus norvegicus* e colágeno IV de *Homo sapiens*.

```
β1Rn          29   AARLLVLASPPASLLPPASEG  49
                   A+++   L   PP+     P S G
Col4a1Mm  638      AGKVVPLPGPPGAAGLPGSPG  658

β1Rn  30       ARLLVLASPPASLLPPASEG  49
                 +++L   PP+     P  S G
Col4a1Hs 639  GKIVPLPGPPGAEGLPGSPG  658
```

Após essas análises iniciamos nosso estudo *in vitro,* para tanto desenhamos e sintetizamos inicialmente três peptídeos. As regiões selecionadas com base nos

estudos prévios teve início no resíduo Ala36 terminando no Trp57, os dois últimos resíduos do terceiro peptídeo sintetizado foram substituídos por W (Trp) e G (Gly) ao invés de Q (Glu) e W (Trp) como na sequência do receptor sendo, portanto: peptídeo 1: ASPPASLLPPAS (1107,28 Da); Peptídeo 2: PPASEGSAPLSQ (1140,22 Da); Peptídeo 3: ASEGSAPLSQWG (1189,26 Da).

Para esse ensaio inicial utilizamos um *pool* da rhMMP-2 produzida em nosso laboratório e após o ensaio *in vitro* observamos que ocorreu hidrólise no peptídeo 1 nas regiões:

Ala 1↓Ser2 , Pro 3↓Pro4 , Pro10↓Ala11

Os peptídeos 2 e 3 ficaram intactos, isto é, sem hidrólise. Esse resultado se mostrou bem positivo, pois a hidrólise do peptídeo 1 pelas previsões do estudo *in sílico* ocorreriam na região do resíduo de serina. Nos resultados obtidos observamos que houve uma hidrólise logo no início do peptídeo 1, entre o resíduo alanina e serina, depois entre duas prolinas e por fim entre o resíduo de prolina e alanina. A hidrólise entre os resíduos de prolinas já era esperado, mesmo não sendo previsto na clivagem *in sílico*, pois o colágeno é composto por uma cadeia polipeptídica com uma sequência de repetições onde geralmente temos: glicina-X-Y, onde X normalmente é uma prolina e Y frequentemente uma hidroxiprolina, e raramente lisina e hidroxilisina (KRAMER et al, 2001). Na literatura encontramos trabalhos como de Seltzer e colaboradores (1990) que estudaram a especificidade da clivagem da MMP-2 utilizando colágeno tipo I desnaturado e peptídeos sintéticos e observaram uma preferencia de clivagem entre os resíduos do aminoácido Gly e

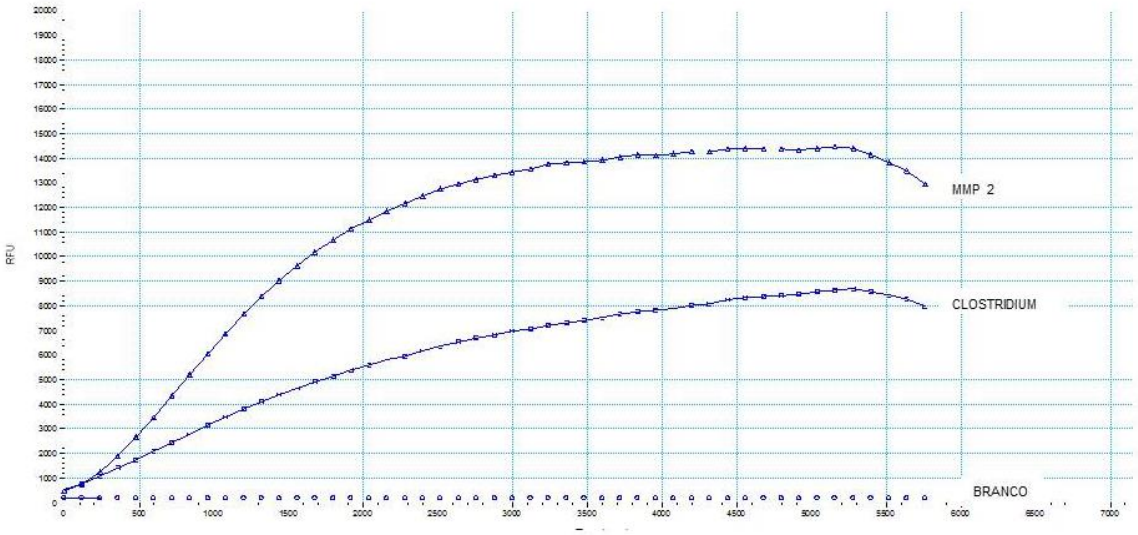
resíduos hidrofóbicos. De forma semelhante nossos resultados mostraram essa preferência.

Com base nesses resultados realizamos uma nova síntese de peptídeos só que agora englobando uma região mais próxima do local onde ocorreu a hidrólise anterior, 1: MGAGALALGASE (1047,2 Da); Peptídeo 2: ASEPCNLSSAAPLPDGA (1599,74 Da); Peptídeo 3: GAATAARLLVLA (1126,37 Da).

Para essa nova análise, devido a problemas com a produção de nossa enzima, optamos por refazer todo o experimento com uma recombinante comercial.

Antes de realizarmos o ensaio *in vitro* fizemos o teste do fluorímetro para testarmos a atividade da enzima comercial, como segue no gráfico a seguir:

Figura 11. Gráfico mostrando a atividade de fluorescência da rhMMP-2. t (s)x RFU



Os resultados obtidos nesta nova hidrólise com a enzima comercial não foi satisfatória! Nenhum dos peptídeos testados sofreu hidrólise, desta forma não

conseguimos replicar os resultados obtidos anteriormente. Hakalahti e colaboradores (2010) utilizando um sistema heterólogo de expressão conseguiram identificar fragmentos da porção N-terminal e constatar dois sítios de clivagem, um entre a Arg31-Leu32 e outro Pro52-Leu53. Inibidores de MMPs foram capazes de inibir esta hidrólise, enquanto a mutação nos resíduo Arg31-Leu32 foi responsável pela maior estabilização do receptor na membrana. Sugerindo que o receptor β1-AR sofreria ação pelas MMPs, isso foi observado nos ensaios *in vitro*.

Embora as atividades *in vitro* possam ser intrigantes uma questão que fica a ser respondida é, será que substratos nesta conformação são biologicamente relevantes *in vivo*?

Coleman e colaboradores (2016) estudando o receptor GPR37L1, um membro na família dos GPCRs abundante no cerebelo, descobriram que ele é constitutivamente ativo quando expresso em cultura de células, mas quando sua região N-terminal é hidrolisada perde sua atividade. Eles descobriram que a hidrólise desta região é mediada por uma metaloprotease e isso ocorreu tanto em cultura de células quanto no próprio cerebelo de roedores, identificando assim, um mecanismo de sinalização desconhecido até aquele momento para este receptor, o que resulta não somente no desenvolvimento crítico para o cerebelo como possíveis implicações em doenças cardiovasculares.

De forma semelhante, Park e colaboradores (2017) estudaram a região N-terminal do β1-AR em sítios onde ocorrem as modificações pós-traducionais como: a O-glicosilação e a N-glicosilação; sítios que são normalmente ignorados, e descobriram que as glicosilações do tipo O-glicosilação previnem a hidrolise do N-

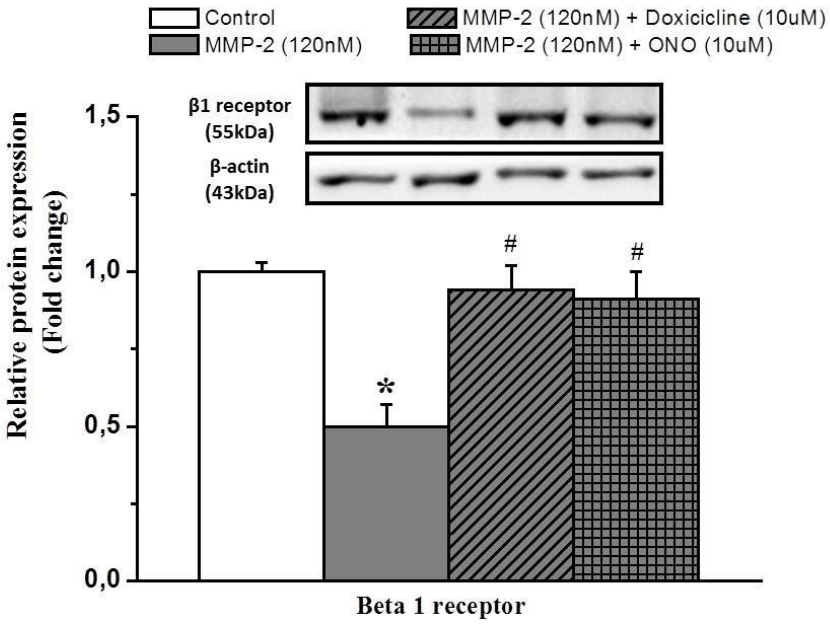
terminal deste receptor bem como influenciam as respostas de sinalização em cardiomiócitos e que mutações sitio dirigida nesses sítios não preveniam a hidrólise.

Overall (2004) cita que trabalhos recentes vêm revelando que as MMPs clivam cada vez mais moléculas bioativas e sinalizadoras, desta forma o dogma de que as MMPs são apenas proteases responsáveis pela remodelação da matriz extracelular ganha outra dimensão. Martínez e colaboradores (2004) relatam que a adrenomedulina, um potente vasodilatador, expresso em células endoteliais e musculares dos vasos sanguíneos é um novo substrato bioativo para as MMPs *in vivo.*

Concomitantemente ao experimento anterior fizemos a análise das culturas de células de cardiomiócitos utilizando a técnica de *western blotting* para verificar a integridade do receptor quando exposto a rhMMP-2. Os resultados mostraram que quando o receptor é exposto a uma concentração de 120mM de rhMMP-2, figura 12, ocorre uma diminuição significativa em sua expressão.

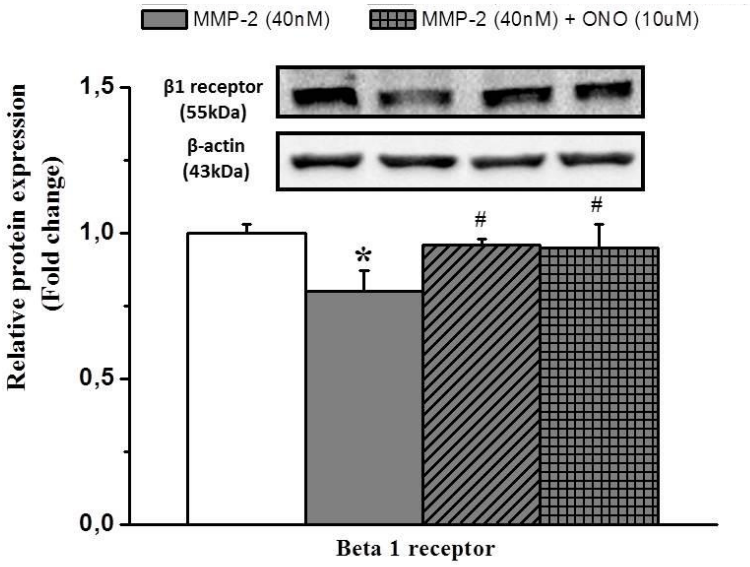
Isso também foi observado em relação a concentração de 40 mM, mas menos evidente que a concentração anterior, além disso quando as células foram tratadas com inibidores, seletivos ou não, houve reversão do processo.

Figura 12. *Western blotting* do receptor β1-AR com anticorpo monoclonal anti- β1-AR controle β1-actina. Quantificação da expressão relativa do receptor após tratamento com 120mM de rhMMP-2, com ou sem inibidores.



* p≤ 0,05 *vs* control, # p≤ 0,05 *vs* MMP-2 (120nM)

Figura 13. *Western blotting* do receptor β1-AR com anticorpo monoclonal anti- β1-AR controle β1-actina. Quantificação da expressão relativa do receptor após tratamento com 40mM de rhMMP-2, com ou sem inibidores.



* p≤ 0,05 *vs* control, # p≤ 0,05 *vs* MMP-2 (40nM)

Ferraz (2012) em ensaios funcionais (dados ainda não publicados) obteve resultado semelhante quando observou a concentração de AMPc em culturas de células de cardiomiócitos previamente tratadas com rhMMP-2. Nas culturas em que a concentração de rhMMP-2 eram maiores houve uma diminuição desse segundo mensageiro. Esse processo foi revertido quando as culturas eram simultaneamente tratadas com os inibidores, doxiciclina ou ONO-4718, indicando assim uma possível ação da rhMMP-2 neste receptor.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

A partir da observação dos resultados podemos sugerir que a rhMMP-2 afeta de alguma forma a dinâmica de funcionamento do receptor β1-AR e vários trabalhos na literatura corroboram nossos resultados. No entanto, quando olhamos isoladamente para os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* com os peptídeos, questionamos o fato da conformação espacial dos aminoácidos e a posição de ancoragem da porção N-terminal na superfície celular, talvez influenciar a ocorrência desta hidrólise. Apesar disso, este trabalho deve ser visto no seu contexto de experimento clínico, com suas vantagens e desvantagens, e neste sentido apresenta uma contribuição científica relevante para a literatura, a qual é: assim como alguns trabalhos anteriores de fato a MMP-2 é uma das proteases capazes de clivar este importantíssimo receptor para o controle da pressão arterial e ritmo cardíaco. Os resultados dos experimentos foram também comparados com predições *in sílico* de clivagens pela sequência de aminoácidos deste receptor pela MMP-2, bem como pela comparação da identidade da região N-terminal do receptor com outras espécies e com outras proteínas que são substratos conhecidos da MMP-2. Os resultados são importantes também para nosso grupo de pesquisa, pois apresentam mais um dos aspectos da participação de MMPs super expressas em algumas doenças cardiovasculares.

As dificuldades encontradas durante a conclusão deste trabalho norteou o grupo para algumas modificações e alterações que serão feitas em experimentos futuros, com a finalidade de responder com mais propriedade a relação entre a MMP-2 e o β1-AR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.L.C., BIRD, R.J. Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**. v.14, p.462-470, doi:101111/j.1440-1797.2009.01128.x, 2009.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. Molecular Biology of the Cell, 4th edition. New York, cap. 15, p.853,2002.

ALI MA, FAN X, SCHULZ R. Cardiac sarcomeric proteins: novel intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in heart disease. **Trends Cardiovasc Med**. v.21, nº4, p.112-118, 2011.

ARPINO, V., BROCK, M., GILL, S.E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. **Matrix Biology**. v. 44-46, p. 247-254, 2015.

AUMAILLEY,M. The laminin family. **Cell Adh. Migr.** v.7, nº 1, p-48-55, 2012.

BANG, I., CHOI, H.J. Structural features of beta2 adrenergic receptor: crystal structures and beyond. **Molecular Cells.** v.38, nº2, p.105-111, 2015.

BARRET, A., WOESSNER, J., RAWLINGS, N. Handbook of proteolytic enzymes. **Academic Press.** vol 1, 2º ed**.** ISBN: **9780080984155, 2004.**

BERGMANN, U., TUUTTILA, A., STETLER-STEVENSON,W.G., TRYGGVASON,K. Autolytic activation of recombinant human 72 kilodalton type IV collagenase. **Biochemistry**. v. 34, nº 9, p. 2819-2825, 1995.

BERRY, E., BOSONEA, A.M., WANG, X., FERNANDEZ-PATRON, C. Insights into the activity, differential expression, mutual regulation and functions of matrix metalloproteinases and A disintegrin and metalloproteinases in hypertension and cardiac disease. **J. Vasc. Res**. v. 50, nº1, p 52-68, 2013.

BIRKEDAL-HANSEN H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr. Opin. Cell. Biol**. v. 7, nº5, p. 728-735, 1995.

BODE, W., REINEMER, P., HUBER, R., KLEINE, T., SCHNIERER, S., TSCHESCHE, H. The X-ray crystal structure of the caralytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. **EMBO J**. v. 13, p. 1263-1269, 1994.

BOUVIER, M. Unraveling the structural basis of GPCR activation and inactivation. **Nat Struct Mol Biol.** v.20, nº5, p.539-541, 2013.

BREW, K., NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1803, nº1, p.55-71, 2010.

COKER, M.L., JOLLY, J.R., JOFFS, C., ETOH, T., HOLDER, J.R., BOND, B.R., SPINALE, F.G. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. **Am J Physiol**. v.28, p. H543–H551, 2001.

COLEMAN, J.L.J., NGO,T., SCHMIDT, J., MRAD, N., LIEW, C.K., JONES, N.M., GRAHAM, R.M., SMITH, N.J. Metalloprotease cleavage of N-terminus of the orphan G protein-coupled receptor CPR37L1 reduces its constitutive activity. **Science Signal**, v.9, p.36, 2016.

COMMUNAL, C., SINGH, M., MENON, B., XIE, Z., COLUCCI, W.S., SINGH, K. β1 integrin expression in adult rat ventricular myocytes and its role in the regulation of β-adrenergic receptor-stimulated apoptosis. **J Cell Biochem.** v. 89, p.381–388, 2003.

COOPER, GM., HAUSMAN RE. Chapter 13: Cell signaling. In: The cell: a molecular Approach. 3rd ed. ASM Press, Washington DC, USA, 2004, p. 541-587.

COPLEY, S.D. Shining a light on enzyme promiscuity. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 47, p. 167-175, 2017.

D'ARMIENTO, J. Matrix Metalloproteinase Disruption of the Extracellular Matrix and Cardiac Dysfunction. **TCM**. v.12, p.3, 2002.

DASH, C., KULKARNI, A., DUNN, B., RAO, M. Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. **Crit Rev Biochem Mol Biol.** v. 38, n.2, p.89-119, 2003.

DE LUCIA, C., FEMMINELLA, G.D., GAMBINO, G., PAGANO, G., ALLOCCA, E., RENGO, C., SILVESTRI, C.,LEOSCO, D., FERRARA, N., RENGO, G. Adrenal adrenoceptors in heart failure. **Front. Physiol.** v.5, p. 1-9, 2014. DOI: 10.3389/fphys.2014.00246.

DEAN, R.A., OVERALL, M.C. Proteomics Discovery of metalloproteinase substrates in the cellular context by iTRAQTM labeling reveals a diverse MMP-2 substrate degradome. **Molecular and Cellular Proteomics**.v.6, p.611-623, 2007.

DIXON, R.A.F., SIGALL, I.S., CANDELORE, M.R., REGISTERL, R.B., SCATTERGOOD, W., RANDS, E., STRADER, C.D. Structural features required for ligand binding to the ,β-adrenergic receptor. **The EMBO Journal.** v.6, nº.11, p.3269-3275, 1987.

ECKHARD, U., MARINO, G., BUTLER, G.S., OVERALL, C.M. Positional proteomics in the era of the human proteome project on the doorstep of precision medicine. **Biochimie**. v.122, p.110-118, 2016.

FERRAZ, K.C., SOUSA-SANTOS, O., NETO-NEVES, E.M., RIZZI, E., MUNIZ, J.J., GERLACH, R.F., TANUS-SANTOS, J. E. Recombinant Human Matrix Metalloproteinase-2 Impairs Cardiovascular b- Adrenergic. **Basic &Clinical Pharmacology & Toxicology**. v.112, p. 103-109, 2013.

FOBIAN, A.D., ELLIOTT, L., LOUIE, T. A Systematic Review of sleep, hypertension and cardiovascular risk in children and adolescents. **Current. Hypertension Reports**. v.20, p.42, doi: 10.1007//s11906-018-0841-7, 2018.

GOLDBERG, G., MARMER, B.L., GRANT, G.A., EISEN, A.Z.,WILHELM,S., HE,C. Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V. 86, p. 8207-8211, 1989.

GONÇALVES, A.N., MESCHIARI, C.A., STETLER-STEVENSON, W. G., NONATO, M. C., ALVES, C. P., ESPREAFICO, E.M., GERLACH, R.F. Expression of soluble and functional full-legth human matrix metalloproteinase-2 in Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**. v. 157, n. 1, p. 20-24, 2012.

GONZÁLEZ- RÁBADE, N., BADILLO-CORONA, J.A., ARANDA-BARRADAS, J.S., OLIVER-SALVADOR MDEL, C. Production of plant proteases in vivo and in vitro- a review. **Biotechnol. Adv**. v.29, nº 6, p. 983-996, 2011

GRUNE, T., SHRINGARPURE, R., SITTE,N., DAVIE, K. Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. **Journal of Gerantology**. v.56A, n.11, p. B459-B467, 2001.

GUREVICH, V.V., GUREVICH, E.V. GPCRs and signal transducers: interaction stoichiometry. **Trends in Pharm. Sci.** in press; doi: 10.1016/j.tips.2018.04.002, 2018.

GYGI, S.P., AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 4, p. 489-494, 2000.

HAKALAHTI, A.E., VIERIMAA, M.M., LILJA, M.K., KUMPULA, E.P., TUUSA, J.T., PETÄJÄ-REPO, U.E. Human b1-adrenergic receptor is subject to constitutive and regulated N-terminal cleavage. **J Biol Chem**. v. 285, p.28850–28861, 2010.

HUGHES, B.G; SCHULZ, R. Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury. **Basic Res Cardiol**. 109:424, 2014.

HUSSAIN, A.A., LEE, Y., ZHANG, J.J., FRANCIS, P.L., MARSHALL, J. Disturbed matrix metalloproteinase pathway in both age-related macular degeneration and Alzheimer´s disease. **Journal of neurodegenerative** diseases. ID : http://dx.doi.org/10.1155/2017/4810232, 2017.

ISAACSON, K.J., JENSEN, M.M., SUBRAHMANYAM, N.B., GHANDEHARI, H. Matrix-metalloproteinases as targets for controlled delivery in cancer: An analysis of upregulation and expression. **Journal of Controlled Release**. v. 259, p. 62-75, 2017.

KASANA, R. C., SALWAN, R., YADAV, S.K. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. **Crit. Rev. Microbiol**. v. 37, nº3, p.262-276, 2011.

KING, S.L.,GOTH, C.K., ECKHARD, U., JOSHI, H.J., HAUE, A. D., VAKHRUSHEV, S., SCHJOLDAGER, K., OVERALL, C.M., WANDALL, H.H. TAILS N-Terminomics

and proteomics reveal complex regulation of proteolytic cleavage by O-glycosylation. **Journal of Biological Chemistry.** doi: 10.1074/jbc.RA118.001978, 2018.

KLEIFELD, O., DOUCET, A., KELLER, U.A.D., PRUDOVA, A., SCHILLING, O., KAINTHAN, R.K., STARR, A.E., FOSTER, L.J., KIZHAKKEDATHU, J.N., OVERALL, C.M. Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. **Nature Biotechnology**. v.28, p. 281-288, 2010.

KLEIFELD, O., DOUCET, A., PRUDOVA, A., KELLER, U. auf dem., GIOIA, M., KIZHAKKEDATHU, J. N., OVERALL, C. M. Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. **Nature Protocols** ,v.6**,** p.1578–1611, 2011.

KOTAS, M.E., MEDZHITOV, R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. **Cell**. v.160, nº5, p.816-827, 2015.

KRAMER, R.Z., BELLA, J., BRODSKY, B., BERMAN, H.M. The crystal and molecular structure of a collagen-like peptide with a biologically relevant sequence. **J. Mol. Biol**. v. 311, p.131-147, 2001.

LATHI, J.L., TANG, G.W., CAPRIOTTI, E.,LIU, T.,ALTMAN,R.B. Bioinformatics and variability in drug response: a protein structural perspective. **J. R. Soc. Interface** . v.9, p.1409–1437, 2012.

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

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**.v. 202, p. 498–499, 1964.

MARTEMYANOV, K.A., GARCIA-MARCOS, M. Making useful gadgets with miniaturized G proteins. **Journal of Biological Chemistry**. v. 293, p. 7474-7475, 2018.

MARTÍNEZ, A., OH H, R., UNSWORTH, E.J., BREGONZIO, C., SAAVEDRA, J.M., STETLER-STEVENSON,W.G., CUTTITTA, F. Matrix metalloproteinase-2 cleavage

of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. **Biochem. J.** v. 383, p. 413-418, 2004.

MCCAWLEY, L.J., MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: they´re not just matrix anymore! **Curr. Opin. Cell. Biol.** v. 13, nº 5, p.534-540, 2001.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p.428-435, 2008.

MENON, B., KRISHNAMURTHY, P., KAVERINA, E., JOHNSON, J.N., ROSS, R. S., SINGH, M., SINGH, K. Expression of the cytoplasmic domin of β1 integrin induces apoptosis in adult rat ventricular myocytes (ARVM) via th involvement of caspase-8 and mitochondrial death pathway. **Basic Research in Cardiology**. v. 101, nº6, p. 485-493, 2006.

MERLE, N.S., CHURCH, S.E., FREMEAUX-BACCHI, V., ROUMENINA, L.T. Complement system part I- molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**. v.6, article 262, DOI: 10.3389/fimmu.2015.00262, 2015.

NAGASE, H., VISSE,R., MURPHY,G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res.** v. 69, p.562-573, 2006.

NASCIMENTO, B. C.,PEREIRA, S.B., RIBEIRO, G. S., MESQUITA, E. T. Polimorfismos beta1-adrenérgico associados com Fibrilação Atrial na Insuficiência Cardíaca Sistólica. **Arq. Bras. Cardiol. [online]**. v.98, nº5, p. 384-389, 2012.

NESARGIKAR, P.N., SPILLER, B., CHAVEZ, R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. **European Journal of Microbiology and Immunology.** v.2, p.103-111, DOI: 10.1556/EuJMI. 2.2012.2.2, 2012.

NETO, M.A., RASCADO, R.R., BENDHACK, L.M. Receptores B-adrenérgicos no sistema cardiovascular Medicina, Ribeirão Preto, **X Simpósio brasileiro de Fisiologia cardiovascular**. v. 39, nº1, p. 3-12, 2006.

OKADA,Y., MORODOMI, T., ENGHILD, J.J., SUZUKI, K., YASUI, A., NAKANISHI, I., SALVESEN, G., NAGASE, H. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid

synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. **Eur. J. Biochem.** P.721-730, 1990.

OSENKOWSKI, P., TOTH, M., FRIDMAN, R. Processing, shedding and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). **Journal Cell Physiol**. v. 200, nº1, p.2-10, 2004.

OSHIMA, N., ONIMARU, H., YAMAMOTO, K., TAKECHI, H., NISHIDA, Y., ODA, T., KUMAGAI, H. Expression and functions of β1 and β2-adrenergic receptors on th bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla. **Hypertension Research**. v. 37, p.976-983, 2014.

OVERALL, C.M. Dilating the degradome: matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) cuts to the heart of the matter. **Biochemical Journal**. v.3, p.383,2004. DOI: 10.1042/BJ20041433.

PARANTHAMAN, R., ALAGUSUNDARAM, K., INDHUMATHI, J. Production of protease from rice mill wastes by Aspergillus niger in solid state fermentation. **World Journal of Agricultural Science.** v.5, p.308-312, 2009.

PARK, M., REDDY, G.R., WALLUKAT, G., XIANG, Y.K., STEINBERG, S.F. β1-adrenergic receptor O-glycosylation regulates N-terminal cleavage and signaling responses in cardiomyocytes. **Nature Sci. Reports**. v.7, p. 7890, DOI: 10.1038/s41598-017-06607-z, 2017.

PEREIRA, S. B., GAVA, I. A.,GIRO, C., MESQUITA, E. T. Os polimorfismos dos receptores adrenérgicos na insuficiência cardíaca: o que a genética explica? **Arq. Bras. Cardiol. [online].** v.94, nº6, p. 841-849, 2010.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cell. Mol. Life Sci**. v. 62, p.2161-2172, 2005.

PRENZEL, N., ZWICK, E., DAUB, H., LESERER, M., ABRAHAM, R., WALLASCH, C., ULLRICH, A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF**. Nature.** v.23-30, p.884-888, 1999.

PRUDOVA, A., KELLER, U., BUTLER,G.S.,OVERALL, C.M. Multiplex N-terminome Analysis of MMP-2 and MMP-9 Substrate Degradomes by iTRAQ-TAILS Quantitative Proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**. v.9, p. 894–911, 2010.

RADISKY, D.C., STALLINGS-MANN, M., HIRAI, Y., BISSELL, M.J. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol**. v.10, p. 228-234, 2009.

RAI, S. K., MUKHERJEE, A. K. Optimization of production of an oxidant and detergent-stable alkaline β-keratinase from *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 47-56, 2011.

RANI, K., RANA, R., DATT, S. Review on latest overview of proteases. **International Journal of Current Life Sciences**. v. 2, nº.1, p. 12-18, 2012.

RAO, M. B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S., DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **American Society for Microbiology***,* v. 62, n. 3, p. 597 – 635, 1998.

RAPPSILBER, J., MANN, M., ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using Stage Tips. **Nature Protocols**, v. 2, nº8, p.1896-1906, 2007.

RATHZ, D.A., BROWN, K.M., KRAMER, L.A., LIGGETT, S.B. Amino acid 49 polymorphisms of the human beta(1)-adrenergic receptor affect agonist promoted trafficking. **J Cardiovasc Pharmacol**. v.39, p.155-160, 2002.

RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J. Handbook of proteolytic enzymes. In: Chapter 77-Introdution: Metallopeptidases and their clans, 2013, Academic Press Elsevier, Oxford, UK, pg.235.

RAWLINGS, N.D; BARRETT, A.J. THOMAS, P.D., HUANG, X., BATEMAN, A., FINN, R.D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER. **Nucleic Acids Res**, v. 46, p. 624-635, 2018.

RAZMARA, A., VALLE, N., MARKOVIC, D., SANOSSIAN, N., OVBIAGELE, B., DUTTA, T., TOWFIGHI, A. Depression is associated with a higher risk of death among stroke survivors. **Journal of Stroke and Cerobrovascular Diseases**.v.26, nº 12, p.2870-2879, 2017.

REHMAN, A. A., AHSAN, H., KHAN, H. Alpha-2-Macroglobulin: A physiological Guardian. **J. Cell. Physiol.** v. 228, p. 1665-1675, 2013.

RIBEIRO, A.L.P., DUNCAN, B.B., BRANT, L.C.C., LOTUFO, P.A., MILL, J.G., BARRETO, S.M. Cardiovascular Health in Brazil- Trends and Perspectives. **Circulation**. v. 133, p. 422-433, 2016.

RIETZ, A., SPIERS, J.P. The relationship between the MMP system, adrenoceptors and phosphoprotein phosphatases. **Journal Pharmacol**. v. 166, nº4, p.1225-1243, 2012.

ROCKMAN, H.A., KOCH, W.J., LEFKOWITZ, R.J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. **Nature**. v.10, nº415, p.206-212, 2002.

RODRIGUES, S.F., TRAN, E.D., FORTES, Z.B., SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. Matrix metalloproteinases cleave the beta2-adrenergic receptor in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Heart Cir. Physiol**, v. 299, p. 25-35, 2010.

ROSENBAUM, D., RASMUSSEN, S.G., KOBILKA, BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. **Nature**. v.459, nº7245, p.356-363, 2009.

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: Rationale and therapeutic approaches. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v.47, p.211-242, 2007.

SELTZER, J.L., AKERS, K.T., WEINGARTEN, H., GRANT, G.A., McCOURT, D.W., EISEN, A.Z. Cleavage specificity of human skin type IV collagenase (gelatinase). Identification of cleavage sites in type I gelatin, with conformation using synthetic peptides. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 265, nº 33, p. 20409-20413, 1990.

SHARMA, N., LEE, J., YOUSSEF, I., SALIFU, M.O., MCFARLANE, S.I. Obesity, Cardiovascular Disease and Sleep Disorders: Insights into the rising epidemic. **Journal of sleep disorders & therapy**. v.6, nº1, p.260, doi: 10.172/2167-0277.1000260, 2017.

SIMONI, R.D., HILL, R.L., VAUGHAN, M. The Use of Isotope Tracers to Study Intermediary Metabolism: Rudolf Schoenheimer. **The Journal Of Biological Chemistry**. v. 277, nº. 43, p.31, 2002.

SOLOMONOV, I., ZEHORAI, E., TALMI-FRANK, D., WOLF, S.G., SHAINSKAYA, A., ZHURAVLEV, A., KARTVELISHVILY, E., VISSE, R., LEVIN, Y., KAMPF, N., JAITIN, D.A., DAVID, E., AMIT, I., NAGASE, H., SAGI, I. Distinct biological events generated by ECM proteolysis two homologous collagenases. **Proceedings of th National Academy of Science**. v.113, nº 39, p. 10884-10889, DOI: 10.1073/pnas.1519676113, 2016.

SPEDA, J.,JOHANSSON, M., CARLSSON, U., KARLSSON, M. Assessment of sample preparation methods for metaproteomics of extracellular proteins. **Analytical Biochemistry**. v. 516, p.23-36, 2017.

SPINALE, F.G. Matrix Metalloproteinases Regulation and Dysregulation in the Failing Heart. **Circ Res.** v.90, p.520-530, 2002.

STANSFIELD, W.E., RANEK, M., PENDSE, A., SCHISLER, J. C., WAG, S., PULINILKUNNIL, T., WILLIS, M. S. Chapter 4- The pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure.**Cellular and Molecular Pathobiology of cardiovascular disease**. P. 51-78, 2014.

STANTON, H., GAVRILOVIC, J., ATKINSON, S.J., D´ORTHO, M.P., YAMADA, K.M., ZARDI, L., MURPHY,G. The activation pf pro-MMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45kDa form. **Journal of Cell Science**. v. 111, p. 2789-2798, 1998.

STRADER, C.D., FONG, T. M., TOTA, M.R., UNDERWOOD, D. Structure an function of G protein-coupled receptors. **Annu. Rev. Biochem**. v. 63, p.101-132, 1994.

STROSBERG, A.D. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. **Protein Science**. v.2, p. 1198-1209,1993.

SUMMERS, R.J., KOMPA, A., ROBERTS, S.J. β-adrenoceptor subtypes and their desensitization mechanisms. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v.17, p.331-343, 1997.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A., AGEE, K.A., HOSHIKA, T., CARRILHO, M., BRESCHI, L., TJADERHANE, L., NISHITANI, Y., CARVALHO, R.M., LOONEY, S., TAY, F.R., PASHELEY, D.H. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. **Dent. Mater.** v. 26, nº 11, p. 1059-1067, 2010.

THOLEN, S. Proteases: Structure and Function. In: Proteolysis regulation networks: exemplary studies. **Springer Science and Business Media.** ISBN: 3709108853, 9783709108857, 2013.

TUTEJA, N. Signaling through G protein coupled receptors. **Plant Signaling & Behavior**. v.4, nº.10, p.942-947, 2009.

UNTERLASS, J.E., WOOD, R.J., BASLÉ, A., TUCKER, J., CANO, C., NOBLE, M.M.E., CURTIN, N.J. Structural insights into the enzymatic and potencial substrate promiscuity of human 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH). **Oncotarget**. v.8, nº61, p. 104478-104491, 2017.

VALLEDORA, L., JORRÍN, J. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal of Proteomics**. v.74, p.1-18, 2011.

VERMA, M.K., PULICHERLA, K.K. Enzyme promiscuity in earthworm serine protease: substrate versatility and therapeutic potencial. **Amino Acids**. v. 48, p:941-948, 2016.

VERMA, S., DIXIT, R., PANDEY, K.C. Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. **Frontiers in Pharmacology**. v.7, p.107, doi:10.3389/fphar.2016.00107, 2016.

VISSE, R., NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**. v. 92, p.827-839, 2003.

WANG,X., BOSONEA, A. M.,FERNANDEZ-PATRON, C. Metalloproteinases: key and common mediators of multiple GPCRs and candidate therapeutic targets in models of hypertensive cardiac disease. **Drug Discov. Today Dis Models**. v.9, nº3, p.103-108, 2012.

WARNE, T., MOUKHAMETZIANOV, R., BAKER, J.G., NEHMÉ, R., EDWARDS, P.C.,LESLIE, A.G.W., SCHERTLER, G.F.X., TATE, C.G. The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta1-adrenergic receptor. **Nature.** v.469, nº 7329, p.241-244, 2011.

WOESSNER,J.F.JR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.** v.5, p.2145-2154, 1991.

WOESSNER,J.F.JR., NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and TIMP´s. **Oxford University Press**. p.76, 2000.

World Health Organization (WHO): http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. Acessado Em: 22/05/2018.

YAMAMOTO, K., MURPHY, G., TROEBERG, L. Extracellular regulation of metaloproteínases. **Matrix Biology**. v. 44-46, p.255-263, 2015.

YAN, X.J.,WILKINS,M.R., OU, K.,GOOLEY, A.A.,WILLIAMS, K.L., SANCHEZ, J.C., GOLAZ, O., PASQUALI, C., HOCHSTRASSER, D.F. Large-scale amino-acid analysis for proteome studies. **Journal of Chormatography A**. v.736, p. 291-302, 1996.

YU, H., TIGCHELAAR, W., KOONEN, D.P.Y., PATEL, H.H., DE BOER, R.A., WIEK, H., VAN GILST, H., WESTENBRINK, B.D., SILLJÉ, H.H.W. AKIP1 expression

modulates mitochondrial function in rat neonatal cardiomyocytes. **PLOS ONE**. v.8, p.1-11, 2013.