UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Purificação e caracterização de inibidores de proteases dos soros *de Crotalus durissus terrificus* e *Didelphis marsupialis*

Tatiana Zapata Palacio

Ribeirão Preto

2019

Tatiana Zapata Palacio

Purificação e caracterização de inibidores de proteases dos soros de *Crotalus durissus terrificus* e *Didelphis marsupialis*

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Eduardo Brandt de Oliveira

Ribeirão Preto

2019

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 A FONTE.

Zapata Palacio, Tatiana

Purificação e caracterização de inibidores de proteases dos soros de *Crotalus durissus terrificus* e *Didelphis marsupialis*. Ribeirão Preto, 2019.

120p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Eduardo Brandt de Oliveira

1. Metaloproteases 2. SVMP 3. Inibidores de Metaloproteases

4. Interações 5. Cinética 6. Inibição de Proteases

7. *Bothrops jararaca* 8. *Crotalus durissus terrificus*.

Imagens da capa:

Foto da serpente *Crotalus durissus terrificus* por Baudilio Rebollo Fernández©

Foto do *Didelphis marsupialis* por Siegrun Hansch©

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Tatiana Zapata Palacio

Título do trabalho: Purificação e caracterização de inibidores de proteases dos soros de *Crotalus durissus terrificus* e *Didelphis marsupialis*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da FMRP para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura:_____

ꕥ A todos os que me acompanharam durante esta caminhada,

e que de uma ou outra forma contribuíram para eu ser melhor hoje ꕥ

Agradecimentos

Me sinto excepcionalmente agradecida com meu orientador, Professor Eduardo Brandt de Oliveira, a quem admiro profundamente pelo imenso conhecimento, ética e integridade que possui. Pela disposição constante e genuína para compartir esse conhecimento com a gente. Pelo suporte constante, guiando-me sempre desde o começo com curiosidade e dedicação. Não poderia ter escolhido melhor orientador.

Um sincero agradecimento à Odete, pela companhia no laboratório e a ajuda técnica nos experimentos.

Gostaria de agradecer também a meu esposo e a minha família pelo apoio constante e as palavras doces nos momentos difíceis. Mesmo na distância são um laço forte que me sustenta.

Aos Professores Vitor Faça, José César Rosa e Pieter Dorrestein por disponibilizar os seus laboratórios para realizar análises necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço imensamente ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do meu doutorado.

E, finalmente, mas igual de importante, quero agradecer ao Brasil! Serei por sempre grata por ter aberto as portas para mim.

“If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?”

Albert Einstein

RESUMO

Palacio, T. Z. **Purificação e caracterização de um novo inibidor de proteases do soro de *Crotalus durissus terrificus.*** 2019. Tese de Doutorado. 120f. Faculdade Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A presença de inibidores no plasma e soro de animais resistentes ao veneno de serpentes, assim como no plasma ou soro de serpentes imunes a seu próprio veneno, é amplamente conhecida. Um grupo destes inibidores são os inibidores de metaloproteases do veneno de serpente (SVMPs), eles têm sido caracterizados do ponto de vista físico químico, porém a falta de informações estruturais e termodinâmicas acerca da sua inibição sobre as SVMPs, tem permanecido como um grande obstáculo para sua aplicação terapêutica ou desenvolvimento como ferramentas moleculares. Por tanto, isolamos um novo inibidor de metaloproteases a partir do soro de *C. d. terrificus*, por nós denominado crotaini, e realizamos a caracterização cinética de sua interação com a bothropasina, uma das principais metaloproteases do veneno de *B. jararaca*, e da mesma forma, caracterizamos cineticamente a interação desta metaloprotease com dos inibidores já conhecidos, DM40 e DM43, isolados do soro de *D. marsupialis*. Determinando as constantes cinéticas mediante cinética enzimática e ressonância plasmônica de superfície (SPR) no Biacore T200. Os valores obtidos permitiram estabelecer que a interação entre o crotaini e a bothropasina, é de alta afinidade, além de evidenciar a sua ligação de forma equimolar e estável. Assim mesmo, o crotaini apresentou uma constante de inibição menor às constantes determinadas para o DM40 e DM43. Adicionalmente, estudos de interação após tratamento quelante da enzima permitem prever que existem diferenças respeito aos domínios estruturais envolvidos na interação do crotaini com a bothropasina, em comparação aos inibidores DM40 e DM43.

Palavras Chave: Metaloproteases, SVMP, Inibidores de Metaloproteases, Interações, Cinética, Inibição de Proteases, *Bothrops jararaca*, *Crotalus durissus terrificus*.

ABSTRACT

Palacio, T. Z. **Purification and characterization of protease inhibitors from *Crotalus durissus terrificus* and *Didelphis marsupialis* sera**. 2019. Tese de Doutorado. 120f. Faculdade Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The presence of inhibitors in plasma or serum from snake venom – resistant animals is well known. These inhibitors are also present in plasma and serum of snakes that are immune to their own venom. A group of these molecules are snake venom metalloprotease inhibitors (SVMPIs). Although the physicochemical properties of these inhibitors are well established, the lack of structural and thermodynamic information has been a bottleneck for their therapeutic use and development as molecular tools. In this work a new metalloprotease inhibitor was isolated from *C. d. terrificus*, and named crotaini. The kinetic interaction of crotaini with bothropasin, one of the main metalloproteases from the *B. jararaca* venom, was investigated. Similarly, the kinetic interactions of crotaini with the inhibitors DM40 and DM43, isolated from *D. marsupialis* serum, were also studied. The kinetic constants were determined by enzymatic kinetics and surface plasmonic resonance (SPR) in a Biacore T200. The obtained values enabled us to demonstrate the high affinity of the inhibitors toward the metalloprotease, achieved through an equimolar and stable complex formation. In addition, studies of interactions of the metaloprotease bothropasin with its inhibitors in the presence of chelant agents revealed differences between that established with crotaini as compared with those made with DM40 and DM43.

Keywords: Snake Venom Metalloproteases, SVMP, Metalloprotease Inhibitors, Interactions, Kinetics, Protease Inhibition, *Bothrops jararaca*, *Crotalus durissus terrificus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Isolamento da bothropasina a partir do veneno da *B. jararaca*. 46

Figura 2. Purificação de inibidor de metaloprotease do soro da *C. d. terrificus*. 49

Figura 3. Purificação dos inibidores de metaloproteases, DM40 e DM43, a partir do soro de *D. marsupialis*. 51

Figura 4. Determinação de massa molecular relativa por eletroforese em SDS-PAGE. ... 52

Figura 5. Espectro de massas da bothropasina. 54

Figura 6. Espectro de massas do crotaini. 54

Figura 7. Espectro de massas do DM40. 55

Figura 8. Espectro de massas do DM43. 55

Figura 9. Alinhamento das sequências de fragmentos trípticos do crotaini com as sequências de proteínas relacionadas. 58

Figura 10. Alinhamento das sequências de fragmentos trípticos do crotaini com as sequências dos fatores BJ46a e BaltMPI. 59

Figura 11. Alinhamento dos fragmentos trípticos da metaloprotease purificada com as sequências da bothropasina e jararhagina. 60

Figura 12. Alinhamento das sequências de fragmentos trípticos dos inibidores DM40 e DM43 putativos com a sequência descrita para o DM43. 61

Figura 13. Ensaio de ligação entre bothropasina e crotaini por SPR. 62

Figura 14. Efeito de quelante de Zn na interação entre bothropasina e crotaini avaliada por SPR. 63

Figura 15. Atividade proteolítica da bothropasina purificada, antes e após tratamento com o-fenantrolina. 64

Figura 16. Determinação de constantes cinéticas para a interação crotaini - bothropasina. 67

Figura 17. Efeito do EDTA sobre a bothropasina em suas interações com substrato e inibidores proteicos. 69

Figura 18. Determinação de constantes cinéticas para a interação entre bothropasina e os inibidores DM40 e DM43. 72

Figura 19. Cromatografias de afinidade de veneno de *B. jararaca* em colunas de Sepharose-DM40 e Sepharose-DM43. 74

Figura 20. Perfis eletroforéticos de frações representativas das cromatografias de afinidade. 75

Figura 21. Fracionamento do veneno de *C. d. terrificus* por filtração em gel. 76

Figura 22. Análise por SPR de interações entre crotaini e componentes do veneno de *C. d. terrificus*.. 78

Figura 23. Obtenção de serinoproteases do veneno de *B. jararaca*. 80

Figura 24. Avaliação das interações de diferentes serinoproteases com o peptídeo SFTI-R por SPR. 81

Figura 25. Determinação de constantes cinéticas para a interação entre diferentes serinoproteases e o inibidor SFTI-R. 84

Figura 26. Determinação de constantes cinéticas ka, kd e K_D para a interação entre as diferentes serinoproteases e o inibidor SFTI-R. 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário do processo de purificação da bothropasina 47

Tabela 2. Resumo do processo de purificação do crotaini 48

Tabela 3. Resumo do processo de purificação dos inibidores DM40 e DM43 50

Tabela 4. Peptídeos trípticos da bothropasina e dos inibidores crotaini, DM40 e DM43 sequenciados 57

Tabela 5. Constantes cinéticas determinadas para a interação bothropasina com o inibidor crotaini 66

Tabela 6. Constantes cinéticas determinadas para a interação entre a bothropasina e os inibidores DM40 e DM43 71

Tabela 7. Constantes cinéticas determinadas para as interações estudadas entre as diferentes serinoproteases e inibidor SFTI-R 83

Tabela 8. Constantes cinéticas determinadas para as interações estudadas entre as diferentes proteases e inibidores 87

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
Ahx	Ácido hexanóico
BApNA	α-Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
CHCA	Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico
DBU	1,8-Diazabiciclo[5.4.0]undec-7-ene
DEAE	Dietanolamina
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DIC	N,N′- Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMF	N-dimetilformamida
DTT	Ditiotreitol
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N′-etilcarbodiimida)
FF	Fast Flow (Fluxo rápido)
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonila
FRs	Frações
HBS-N	Hepes-buffered saline (Solução salina tamponante de HEPES)
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ka	Constante de associação
kd	Constante de dissociação
K_D	Constante de dissociação no equílibrio
K_i	Constante de inibição

K_M	Concentração do substrato em Vmax/2
LCMS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico
NHS	N-hidroxisuccinimida
NMP	N-metilpirrolidona
PMM	Padrão de massas moleculares
SFTI	Sun Flower Trypsin Inhibitor (Inibidor de tripsina do girassol)
SPPS	Síntese de peptídeos em fase sólida
SPR	Ressonância de superfície plasmônica
SSN	Solução salina normal
TA30	30:70 (v/v) Acetonitrila : TFA 0.1% em água
TA50	50:50 (v/v) Acetonitrila : TFA 0.1% em água
TFA	Ácido trifluoroacético
TNBS	Ácido 2,4,6- trinitrobenzeno sulfônico
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
V_0	Velocidade inicial da reação
V_{max}	Velocidade máxima da reação

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE TABELAS vi

ABREVIATURAS vii

1. INTRODUÇÃO 13

1.1 Metaloproteases (SVMPs) 14

1.2 Inibidores de metaloproteases (SVMPIs) 16

1.3 Ressonância plasmônica de superfície (SPR) 18

2. OBJETIVOS 21

2.1 Objetivo geral 21

2.2 Objetivos específicos 21

3. MATERIAIS 22

3.1 Veneno de *Bothrops jararaca* 22

3.2 Soro da *Crotalus durissus terrificus* 22

3.3 Soro do *Didelphis marsupialis* 23

3.4 Reagentes 23

4. MÉTODOS 24

4.1 Isolamento da metaloprotease bothropasina 24

4.1.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose FF 24

4.1.2 Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S200 25

4.2 Purificação de um inibidor de metaloproteases do soro de *C. d. terrificus* 25

4.2.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose FF 25

4.2.2 Cromatografia de troca iônica em MonoQ™ 26

4.2.3 Cromatografia em fase reversa em coluna Pro-RPC™ 26

4.3 Purificação dos inibidores de metaloproteases DM40 e DM43 27

4.3.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose FF 27

4.3.2 Cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose CL 4B 28

4.4 Obtenção de metaloproteases e serinoproteases mediante cromatografias de afinidade com inibidores 29

4.4.1 Cromatografia de afinidade para metaloproteases 29

4.4.2 Cromatografia de afinidade e exclusão molecular para serinoproteases 30

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS 31

4.6 Avaliação da atividade proteolítica 32

4.6.1 Hidrólise de substratos peptídicos de fluorescência apagada 32

4.6.2 Hidrólise do BApNA 32

4.7 Avaliação da inibição de atividade proteolítica 33

4.7.1 Inibição da proteólise catalisada pela metaloprotease 33

4.7.2 Inibição da atividade de serinoproteases 34

4.8 Sínteses de peptídeos em fase sólida 34

4.8.1 Lavagem da resina 35

4.8.2 Remoção do grupo Fmoc 35

4.8.3 Acoplamento dos Fmoc aminoácidos 36

4.8.4 Clivagem dos peptídeos da resina 36

4.9 Espectrometria de massas 37

4.9.1 Determinação de massa intacta 37

4.9.1.1 Crotaini 37

4.9.1.2 Bothropasina, DM40 e DM43 37

4.9.2 Sequenciamento de peptídeos trípticos 38

4.10 Sínteses de resina de afinidade SFTI-R 41

4.11 Síntese resina de afinidade derivatizadas com DM40 e DM43 42

4.12 Ressonância plasmônica de superfície (SPR) 43

5. RESULTADOS 45

5.1 Purificação da metaloprotease Bothropasina 45

5.2 Purificação do inibidor de metaloproteases do soro de *C. d. terrificus*. 47

5.3 Isolamento dos inibidores de metaloproteases DM40 e DM43 do soro de *Didelphis marsupialis*. 50

5.4 Determinação da massa molecular 52

5.4.1 Caracterização da bothropasina e de inibidores de metaloproteases por SDS-PAGE 52

5.4.2 Caracterização da bothropasina e de inibidores de metaloproteases por espectrometria de massas 53

5.5 Caracterização das proteínas bothropasina, crotaini, DM40 e DM43 por sequenciamento dos respectivos fragmentos trípticos. 56

5.6 Análise da interação entre o crotaini e a bothropasina 61

5.7 Determinação das constantes cinéticas da interação entre crotaini e bothropasina. 64

5.8 Análise da interação entre a bothropasina e os inibidores DM40 e DM43 68

5.8.1 Determinação das constantes cinéticas da interação entre a bothropasina e os inibidores DM40 e DM43 69

5.9 Cromatografia de afinidade de veneno de *B. jararaca* em resinas de Sepharose-DM40 e Sepharose-DM43 73

5.10 Análise da interação entre o crotaini e proteínas do veneno de *C. d. terrificus* ... 75

5.10.1 Fracionamento do veneno de *C. d. terrificus* 76

5.10.2 Medidas de interação entre componentes do veneno de *C. d. terrificus* e crotaini. 77

5.11 Análise da interação de serinoproteases do veneno de *B. jararaca* com o inibidor sintético SFTI-R 78

5.11.1 Obtenção de diferentes serinoproteases do veneno de *B. jararaca* 79

5.11.2 Avaliação da interação entre o SFTI-R e diferentes serinoproteases 81

5.11.3 Determinação das constantes cinéticas da interação entre o SFTI-R e serinoproteases do veneno de *B. jararaca* 81

6. DISCUSSÃO 86

7. CONCLUSÕES 107

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 108

9. ANEXOS 113

1. INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas, peptídeos e outros componentes (Ramos e Selistre-De-Araujo 2006) com diversas e múltiplas ações biológicas direcionadas a variados alvos moleculares, tendo como principal função a predação, facilitando a captura de presas ou, ainda, a defesa contra predadores (Chippaux, Williams e White 1991, Casewell et al. 2013). A proporção quantitativa destes componentes dentro do veneno varia largamente segundo vários fatores: espécie da serpente, localização geográfica, gênero, idade e tamanho (Chippaux et al. 1991). De maneira geral, o conteúdo proteico é cerca ao 90% do peso seco do veneno nas serpentes peçonhentas (Bieber 1979), a conformação proteica deste grupo varia entre as diferentes famílias de serpentes, entre espécies ou mesmo entre indivíduos de uma dada espécie (Francischetti et al. 2000, Calvete 2013, Serrano et al. 2014). Exemplo de variação na composição proteica entre diferentes famílias se observa comparando o veneno das serpentes *B. jararaca* e *C. d. terrificus*, ambas formando parte da família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*. Do total de proteínas no veneno de *B. jararaca*, as metaloproteases (SVMP), serinoproteases, lectinas, L-aminooxidases (LAO), e fosfolipases A_2 (PLA_2), representam 50, 14, 18, 12 e 3% respectivamente, conformando as cinco classes principais de proteínas encontradas no veneno botrópico (Fox e Serrano 2008a). Já no veneno de *C. d. terrificus*, a parte proteica está principalmente formada pelas PLA_2, serinoproteases, 5'-nucleotidases, SVMP, e fosfodiesterases com as seguintes quantidades relativas: 49, 25, 8, 4 e 2 % respectivamente (Georgieva et al. 2010). Além destas variações quantitativas na composição dos venenos, existem também variações qualitativas dentro de cada classe de proteínas que os compõem (Casewell 2012).

1.1 Metaloproteases (SVMPs)

As metaloproteases do veneno de serpente, SVMPs, estão classificadas no clã MA das metzincinas, na família M12B das adamalisinas, junto com as proteínas ADAMs (enzimas com domínios desintegrina e metaloprotease) e as ADAMTS (ADAM com motivos de trombospondina), devido à homologia na sua sequência, especialmente no domínio catalítico (Casewell 2012), de forma tal que as famílias representam sequências relacionadas e os clãs relações estruturais (Rawlings et al. 2014).

A atividade catalítica destas SVMPs e ADAMs é dependente de zinco, o qual está coordenado com três histidinas altamente conservadas no sitio catalítico dentro do motivo HEXXHXXGXXH, que é seguido por um *Met-turn*, uma característica estrutural conservada na qual uma metionina, localizada aos 24 resíduos depois da primeira histidina ligante do zinco, forma uma base hidrofóbica para o zinco no sitio catalítico (Stocker e Bode 1995, Casewell 2012). Porém tem sido observado que várias ADAMs carecem do motivo HEXXHXXGXXH e, portanto não exibem atividade proteinolítica (Fox e Serrano 2005).

Por sua vez, estas SVMPs são agrupadas em diferentes classes segundo o processamento catalítico dos seus domínios, estando na classe P-I SVMPs que possuem só o domínio catalítico, na classe P-II se encontram as SVMPs que possuem o domínio catalítico ligado a um domínio desintegrina, à classe P-III pertencem SVMPs que possuem domínio catalítico, domínio tipo desintegrina e domínios ricos em cisteinas, dentro desta classe se encontram SVMPs que adicionalmente apresentam domínios tipo lectina (P-IIId) (Fox e Serrano 2005, Fox e Serrano 2008b).

As SVMPs são enzimas com um papel relevante na fisiopatologia observada nos acidentes ofídicos, ao agir diretamente sobre substratos das estruturas capilares,

degradando o leito microvascular, o que resulta em hemorragias locais e sistêmicas que produzem alterações na hemostase (Gutiérrez, Rucavado e Escalante 2010). Também exercem atividade proteolítica sobre outros substratos biológicos, estando envolvidas na fibrinólise, fibrinogenólise, ativação de alguns fatores da cascata de coagulação, apoptose vascular, e inibição da agregação plaquetária (Ramos e Selistre-De-Araujo 2006, Escalante et al. 2011).

A serpente *B. jararaca* se encontra distribuída no sudeste brasileiro (Sazima 1992), sendo, junto com as serpentes do gênero *Bothrops*, responsável pelo maior número de acidentes ofídicos no país, com uma alta morbidade devido às características do envenenamento (Pinho e Pereira 2001, FUNASA 2001). Duas das principais metaloproteases do veneno de *B. jararaca* são a bothropasina e a jararhagina. Ambas são glicoproteínas acidas, com pI de 4.8 e 4.5, respectivamente, pertencendo à classe P-III da SVMPs. Por SDS-PAGE foi determinada a massa da bothropasina em 50 kDa e da jararhagina em 52 kDa. A estrutura tridimensional nativa de ambas metaloproteases é dependente de pontes dissulfeto e zinco, sendo desnaturadas em presença de EDTA, o-fenantrolina ou ditiotreitol. Entre os substratos frequentemente usados para ensaios de atividade destas SVMPs se encontram a caseína, o fibrinogênio e o colágeno. As doses hemorrágicas mínimas da bothropasina e da jararhagina foram determinadas em 1μg e 1,5 μg, respectivamente (Mandelbaum et al. 2013, Moura-da-Silva e Paine 2013).

No entanto, a hemorragia e proteólise produzida pelas SVMPs, tão característica nos envenenamento botrópicos, e também nos envenenamentos com serpentes *Crotalus* do hemisfério norte, como a *Crotalus atrox* (Bjarnason e Fox 1988), não são observadas nos envenenamentos com a serpente *C. d. terrificus*, serpente amplamente distribuída em América do Sul e responsável pela maioria dos acidentes ofídicos letais no Brasil (FUNASA

2001). Os efeitos característicos do envenenamento por *C. d. terrificus* são neurotóxicos, miotóxicos, nefrotóxicos e distúrbios na cascada de coagulação (Georgieva et al. 2010).

Contudo, o estudo venômico de venenos crotalídeos tem revelado que 4% da composição proteica do veneno corresponde às SVMPs. Porém no veneno de *C. d. terrificus* não têm sido identificadas SVMPs, enquanto que nos venenos de serpentes relacionadas, *C. d. durissus* e *C. d. collilineatus*, tem sido identificadas algumas SVMPs compostas pelo domínio catalítico e desintegrina da classe P-II (Georgieva et al. 2010).

1.2 Inibidores de metaloproteases (SVMPIs)

Desde há algumas décadas tem sido conhecida a imunidade que alguns animais e as próprias serpentes possuem frente aos venenos ofídicos (Noguchi 1909). Esta imunidade é atribuída à presença de proteínas no soro ou plasma dos animais imunes (Perales et al. 2005). No caso das serpentes a presença destas proteínas as protege dos efeitos deletérios de seu próprio veneno ou veneno de serpentes filogeneticamente relacionas (Sanchez e Rodriguez-Acosta 2008). Acredita-se que os animais que exibem imunidade aos venenos são os que tem co-habitado com as serpentes como presa ou predador destas desde tempos remotos, desenvolvendo resistência natural transmitida geneticamente à descendência em decorrência de processo de coevolução (Casewell et al. 2013, Neves-Ferreira et al. 2017).

Uma classe importante destes inibidores é composta pelos inibidores de metaloproteases, SVMPIs. Eles têm sido identificados e isolados a partir do soro ou plasma de serpentes venenosas e não venenosas e de pequenos mamíferos (Perales et al. 2005, Neves-Ferreira et al. 2010). Estes inibidores se caracterizam por ser glicoproteínas plasmáticas de caráter ácido, com massas moleculares na faixa de 40 a 95 kDa,

termoestáveis e funcionais em uma ampla faixa de pH, com pontos isoelétricos entre 3,5 e 5,4. Eles exercem inibição sobre as SVMPs sem envolver proteólise, ligando-se à enzima não covalentemente, formando complexos termodinamicamente muito estáveis que, assim, inativam a enzima (Neves-Ferreira et al. 2017).

Os inibidores provenientes do soro de serpentes estão classificados no clã IH, família I25, como proteínas do tipo cisteíno – símile que não apresentam a atividade inibitória proteolítica sobre as cisteíno proteases (Rawlings, Tolle e Barrett 2004). O inibidor melhor caracterizado deste grupo é o fator BJ46a. Este fator, com massa molecular de 46 kDa e de 79 kDa na sua forma nativa ao formar homodímeros, e pI de 4,6, foi isolado por Valente et al.,(2001), mediante precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose, e duas cromatografias em fase reversa em coluna C4. O BJ46a inibe a atividade hemorrágica de *B. jararaca*, e a atividade proteolítica de jararhagina e a atrolisyn C, uma SVMP da classe P-I do veneno de *C. atrox* (Valente et al. 2001).

Por outro lado, do grupo de SVMPIs isolados a parir do soro de animais resistentes aos venenos de serpentes, o DM43 é o mais amplamente estudado. Este, junto com o DM40, estão classificados no clã JM, família I43, apresentando um enovelamento proteico característico e similar ao da imunoglobulina G (Neves-Ferreira et al. 2010). Este fator DM43 foi isolado por Neves-Ferreira et al., (2001), a partir do soro do *D marsupialis*, mediante cromatografia em DEAE Sephacel, precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose, e cromatografia em Superdex. O DM43 possui uma massa molecular de 43 kDa, formando também homodímeros de ~78kDa em seu estado nativo, e da mesma forma que outros SVMPIs

identificados, exerce a atividade inibitória sobre as SVMPs ao formar complexos estáveis com a enzima (Neves-Ferreira et al. 2010).

1.3 Ressonância plasmônica de superfície (SPR)

Atualmente é conhecido que na inibição exercida sobre as SVMPs por estes inibidores isolados a partir do soro de serpentes ou animais resistentes ao veneno das serpentes, não está envolvida a proteólise da enzima, e que está inibição se produz pela formação de um complexo estável enzima – inibidor de caráter reversível (Neves-Ferreira et al. 2010). Porém, mesmo conhecendo as características físico-químicas das SVMPs e dos inibidores destas metaloproteases provenientes do soro de animais resistentes, o mecanismo exato e detalhes estruturais mediante o qual se dá a inibição permanecem ainda desconhecidos (Bastos et al. 2016, Neves-Ferreira et al. 2017).

Com o intuito de obter informações que ajudem entender o mecanismo por detrás da inibição e da formação do complexo, analisamos as interações entre as SVMPs e os inibidores isolados mediante ressonância plasmônica de superfície (SPR) no Biacore T200.

A técnica de ressonância plasmônica de superfície, SPR, é uma técnica estabelecida para o estudo de interações moleculares em tempo real e de forma tal que não é necessário marcar nenhuma das moléculas envolvidas na interação, ao mesmo tempo que as quantidades de amostra necessárias para realizar as análises são muito pequenas e simples de preparar (Myszka 1997). Isto tem potencializado o rápido desenvolvimento da técnica nos últimos anos, especialmente a sua aplicação no estudo de interações biomoleculares e a determinação das constantes cinéticas que regem estas interações (Wang, Xu e Chen 2015). O que tem permitido avançar na caracterização de como a

complexação ocorre entre as moléculas estudadas, e possibilitando um maior entendimento dos mecanismos de ligação (Myszka 1997).

Na técnica de SPR para medir as interações, uma das moléculas deve ser imobilizada covalentemente, mediante reações químicas com grupos carboxílicos disponíveis nas cadeias de carboximetilcelulose que se encontram ancoradas sobre a superfície metálica do chip, sendo denominada de ligante a molécula imobilizada, e analitos as outras moléculas injetadas sobre o ligante para estudar as suas interações. As leituras são registradas na forma de sensorgramas, que permitem identificar a ligação entre as moléculas estudadas, determinar a afinidade da sua interação e medir as constantes de associação e dissociação da ligação (Homola, Yee e Gauglitz 1999). O sinal registrado é proporcional à quantidade do complexo formado entre o ligante e o analito, e, a medida de ressonância máxima registrada sendo proporcional à máxima capacidade da superfície para ligar o analito (Liu et al. 2008).

O princípio da técnica SPR consiste em um processo físico que acontece quando um plano de luz polarizada incide sobre a superfície delgada de metal gerando a ressonância plasmônica, de forma que a luz refletida se encontra dentro do ângulo total de reflexão interna. Quando o analito interage com o ligante imobilizado na superfície do chip, produz mudanças no índice de refração da luz que incide sobre o chip, gerando assim os sensorgramas registrados experimentalmente (Rich e Myszka 2001).

Na literatura da última década se encontram numerosos trabalhos que exploram a técnica de SPR no estudo de interações e determinações cinéticas, gerando informação que ao ser associada com informações estruturais das moléculas envolvidas na interação, possibilita desvendar os mecanismos moleculares que a compreendem. Alguns destes estudos se concentram nas interações entre metaloproteases bacterianas ou

metaloproteases de matriz com inibidores, porém estudos específicos mediante esta técnica entre as SVMPs e os SVMPIs são exíguos, havendo até hoje só dois trabalhos nos quais foram determinadas as constates cinéticas deste tipo de interação (Brand et al. 2012, Neves-Ferreira et al. 2017).

Portanto, realizaram-se os estudos de interação entre as SVMPs e os SVMPIs mediante SPR, sendo estes estudos sobre os aspectos estruturais e termodinâmicos da interação necessários para poder avançar na aplicação dos SVMPIs, não só como alternativas terapêuticas no tratamento dos acidentes ofídicos, mas também como ferramentas moleculares no estudo de diversas patologias e processos fisiológicos que envolvem a regulação de proteases.

Desta forma, nosso trabalho foi direcionado à obtenção das constantes cinéticas e o estudo da interação entre o novo inibidor de metaloproteases purificado a partir do soro de *C. d. terrificus* e uma das principais metaloproteases do veneno de *B. jararaca*, a bothropasina, e também a sua interação com proteínas do próprio veneno de *C. d. terrificus*, assim como o estudo comparativo com os inibidores de metaloproteases DM40 e DM43, e a interação destes com a bothropasina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar um novo inibidor de metaloproteases a partir do soro de *C. d. terrificus* e estudar quantitativamente a sua interação com proteases ofídicas e comparativamente a inibição com outros inibidores de proteases.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar serino- e metaloproteases do veneno de *B. jararaca* para servir como alvo para inibidores purificados.
- Isolar e caracterizar estrutural e funcionalmente inibidores de metaloproteases a partir dos soros de *C. d. terrificus* e de *D. marsupialis*.
- Determinar constantes de ligação e de inibição de alguns compostos sintéticos sobre serinoproteases ofídicas.
- Aprofundar as descrições de interações protease-inibidor pela análise conjunta de constantes de ligação determinadas por ressonância plasmônica e respectivas constantes cinéticas.

3. MATERIAIS

3.1 Veneno de *Bothrops jararaca*

O veneno de *B. jararaca* foi extraído de serpentes do Serpentário da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto. Após cristalização à temperatura ambiente, foi mantido a 4°C até seu uso.

3.2 Soro da *Crotalus durissus terrificus*

O soro de *C. d. terrificus* foi extraído de serpentes do serpentário da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, seguindo o protocolo de flebotomia na veia caudal (Divers 2006). Realizou-se assepsia do sitio da punção, seis a sete escamas abaixo da cloaca, para evitar ferir órgãos internos da serpente; uma agulha hipodérmica G23, em seringa de 3 mL, foi cuidadosamente inserida em ângulo de 45 graus em direção crâniodorsal na linha media ventral, fazendo-se uma ligeira pressão negativa com a seringa e retrocedendo lentamente caso a agulha tivesse atingido alguma vértebra. Um volume máximo de 1,5 mL foram coletados de sangue de cada serpente, que foi deixado coagular à temperatura ambiente por 3 horas, após o que foi centrifugado a 5000 x g por 5 min. O soro obtido foi armazenado a 4°C até seu uso.

A coleta do sangue e a manipulação dos animais foram realizadas conforme os preceitos da Lei n° 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899 d 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), contando com a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo n° 026/2018 – Anexo 1)

3.3 Soro do *Didelphis marsupialis*

O soro do *D. marsupialis* foi obtido mediante colaboração com o Bosque e Zoológico Municipal Fábio Barreto de Ribeirão Preto. Realizou-se no zoológico a captura dos gambás e extração do sangue pela veia caudal. O sangue coagulado dos gambás foi então centrifugado a 5000 x g por 5 min, obtendo-se o soro que foi armazenado a 4°C até seu uso.

A coleta do sangue e a manipulação dos animais foram realizadas conforme os preceitos da Lei n° 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899 d 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), contando com a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo n° 026/2018 – Anexo 1)

3.4 Reagentes

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico. A água deionizada utilizada em todos os experimentos foi obtida no laboratório em sistema de osmose reversa. Nos experimentos de ressonância plasmônica de superfície, no Biacore, foi utilizada água tipo I obtida no MilliQ® (Miillipore). Os demais materiais e equipamentos estão descritos junto às metodologias em que foram usados.

4. MÉTODOS

4.1 Isolamento da metaloprotease bothropasina

A bothropasina, uma das principais enzimas proteolíticas presentes no veneno da serpente *B. jararaca*, foi isolada mediante modificação do procedimento descrito por Oliveira et al., (2009), para ser utilizada ao longo deste trabalho no estudo dos inibidores de metaloproteases. As etapas executadas foram as seguintes:

4.1.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose FF

Cerca de 400 mg de veneno cristalizado de *B. jararaca* foram diluídos em SSN e dialisados *overnight* contra tampão A, Tris HCl 50 mM, pH 7,5. A solução do veneno foi centrifugada a 16000 x g por 4 minutos a temperatura ambiente, e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de DEAE Sepharose FF (1,4 x 30 cm) equilibrada previamente com tampão A. A cromatografia foi efetuada usando-se gradiente linear de tampão B, Tris HCl 50 mM, NaCl 400 mM, pH 7,5, em tampão A, coletando-se frações de 5 mL em coletor de frações 2070 Ultrorac® II (LKB Bromma), com fluxo de 2 mL/min controlado pela bomba constaMetric® 4100 (LDC Analytical). Os conteúdos de proteína nas frações coletadas foram avaliados por absorbância a 280 nm em espectrofotômetro UV-150-02 Double-beam (Shimadzu), e as respectivas atividades proteolíticas medidas como descrito no item 4.6.1. Um *pool* das frações com as maiores atividades foi formado considerando-se também os respectivos perfis eletroforéticos, determinados como descrito no item 4.5. O material contido neste *pool* foi submetido à etapa cromatográfica seguinte.

4.1.2 Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S200

O material do *pool* obtido na cromatografia de troca iônica foi concentrado sob pressão de N_2 em câmara de ultrafiltração da Amicon® equipada com membrana YM10, até um volume de 800 µL; após centrifugação a 16000 x g por 4 minutos o material foi aplicado à coluna de Sephacryl S200 (0,9 x 77 cm), previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 10 mM. A eluição das proteínas foi realizada com fluxo de 0,05 mL/min, coletando-se frações de 0,5 mL. De cada fração os respectivos perfis eletroforéticos e atividades proteolíticas foram determinados como descrito nos itens 4.5 e 4.6.1. Um *pool* das frações ativas foi formado, confirmando-se posteriormente, item 5.4.2, que a protease obtida era a bothropasina.

4.2 Purificação de um inibidor de metaloproteases do soro de *C. d. terrificus*

Um novo inibidor de metaloproteases foi isolado do soro de *C. d. terrificus.* Em cada etapa cromatográfica do processo de purificação foram recuperadas as frações correspondentes à atividade inibitória mais conspícua frente à bothropasina. O inibidor foi parcialmente caracterizado estruturalmente e aspectos de sua interação com bothropasina estudados.

4.2.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose FF

A amostra de soro de *C. d. terrificus* cromatografada em coluna de DEAE Sepharose FF (0,63 x 35 cm) foi preparada adicionando-se 1 mL de Tris HCl 20 mM, NaCl 40mM, pH 8,1 (tampão A) a 1 mL de soro. Após centrifugação a 16000 x g por 4 minutos para

clarificação, a amostra foi aplicada à coluna equilibrada em tampão A com fluxo de 0,25 mL/min, coletando-se frações de 1,7 mL. Após passagem de 1 volume de coluna de tampão A, a eluição das proteínas foi efetuada com gradiente linear de tampão B, Tris HCl 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8,1, em tampão A. A atividade inibitória de cada fração sobre a atividade proteolítica da bothropasina foi avaliada como descrito no item 4.7.1, e os respectivos conteúdos proteicos e perfis eletroforéticos determinados como descrito anteriormente. Um *pool* das frações ativas foi formado e submetido à etapa cromatográfica seguinte.

4.2.2 Cromatografia de troca iônica em MonoQ™

A etapa de purificação em coluna MonoQ™ (0,5 x 5 cm; GE Healthcare Life Sciences) do inibidor de metaloproteases obtido do soro de *C. d. terrificus* foi efetuada à temperatura ambiente com 20 mL de gradiente linear de concentração de NaCl de 40 mM a 800 mM em tampão Tris HCl 20 mM, pH 8,1. O fluxo de tampão foi mantido a 1,2 mL/min, coletando-se frações de 0,6 mL. A amostra aplicada, proveniente da cromatografia em DEAE Sepharose, foi previamente concentrada e equilibrada com tampão Tris HCl 20 mM, pH 8,1 contendo NaCl 40 mM, usando-se pressão de N_2 em câmara de ultrafiltração Amicon® equipada com membrana YM10. A atividade inibitória de cada fração coletada sobre a atividade proteolítica da bothropasina foi avaliada como descrito no item 4.7.1, e os respectivos conteúdos proteicos e perfis eletroforéticos determinados como descrito anteriormente. Um *pool* das frações ativas foi formado e submetido à etapa cromatográfica seguinte.

4.2.3 Cromatografia em fase reversa em coluna Pro-RPC™

A etapa cromatográfica em coluna de fase reversa Pro-RPC™ (0,5 x 10 cm, GE Healthcare Life Sciences) na purificação do inibidor de protease de soro de *C. d. terrificus*, foi efetuada à temperatura ambiente com fluxo de 0,5 mL/min com gradiente de 1%/min de ACN em TFA 0,1%, coletando-se frações com base na A_{215nm} do efluente em tempo real. O cromatógrafo usado era composto pelos seguintes módulos da Shimadzu, Co., Japan: controlador SCL-10A VP; duas bombas binárias, LC 10AD e LC20AD; autoinjetor SIL-10AF; e detector UV/Vis SPD-6AV acoplado à placa de aquisição de dados DATAQ DI-190. A amostra, proveniente da etapa de purificação em coluna MonoQ™, foi preparada para análise por redução de volume sob pressão de N_2 em câmara de ultrafiltração Amicon® equipada com membrana YM10, seguida de adição de TFA para 0,1% e ACN para 5%. As atividades inibitórias dos materiais coletados sobre a atividade proteolítica da bothropasina foram avaliadas como descrito no item 4.7.1, e os respectivos perfis eletroforéticos por SDS-PAGE como indicado no item 4.5. O material da fração de maior atividade específica foi liofilizado e denominado Crotaini, sendo utilizado ao longo deste trabalho.

4.3 Purificação dos inibidores de metaloproteases DM40 e DM43

A metodologia para purificação dos inibidores de proteases DM40 e DM43, a partir do soro de *D. marsupialis*, foi adaptada da descrita por Neves-Ferreira *et al.*, (2000). Esta adaptação permitiu reduzir o número de passos cromatográficos para o isolamento destes dois inibidores.

4.3.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose FF

A primeira etapa na purificação dos inibidores de protease presentes no soro de gambá foi efetuada por cromatografia em coluna de DEAE Sepharose FF (1,4 x 30 cm) à temperatura ambiente, sob fluxo de 2 mL/min. A amostra aplicada foi preparada por diálise de 11 mL de soro contra 3 L de tampão Tris HCl 1 mM, NaCl 10 mM, pH 7,2, a 4°C durante a noite seguida de diálise por 40 minutos a 4°C contra 1 L do tampão inicial da cromatografia, acetato de sódio 50 mM, NaCl 10 mM, pH 4,0. Após a diálise a amostra foi clarificada por centrifugação a 16800 x g por 4 minutos e aplicada à coluna; após eluição das proteínas que não se ligaram à coluna com 200 mL de tampão inicial, aplicou-se um gradiente linear de concentração de NaCl de 100 mM a 400 mM em tampão acetato 50 mM, pH 4,0, com volume total de 300 mL, para recuperação das proteínas retidas na coluna. Foram coletadas frações de 7 mL, cujos conteúdos de proteína foram avaliados por A_{280nm} e os respectivos perfis eletroforéticos obtidos por SDS-PAGE, como descrito no item 4.5, e atividades inibitórias sobre a atividade proteolítica da bothropasina, como descrito no item 4.7.1. Foram formados dois *pools* com as frações de maiores atividades específicas que foram, individualmente, submetidos à etapa cromatográfica seguinte.

4.3.2 Cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose CL 4B

Nesta etapa dos processos de purificação cada amostra com atividade inibitória obtida por troca aniônica foi aplicada à coluna de Phenyl Sepharose CL 4B (1,6 x 20 cm) e cromatografada percolando-se 40 mL de fosfato de sódio 0.1 M contendo sulfato de amônio 1 M, pH 7,0, seguido por 160 ml de gradiente linear de concentração de sulfato de amônio de 0,5 M a 0 M em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, com fluxo de 0,5 mL/min e frações coletadas de 3 mL. As amostras foram preparadas precipitando-se as proteínas, inicialmente, por adição de sulfato de amônio saturado até atingir 80% de saturação,

recuperando-se o precipitado por centrifugação a 500 x g por 15 minutos e redissolvendo-se as proteínas em tampão fosfato contendo sulfato de amônio 1 M. Os conteúdos de proteína das frações coletadas foram avaliados por A_{280nm} e os respectivos perfis eletroforéticos foram obtidos por SDS-PAGE, como descrito no item 4.5, e as atividades inibitórias sobre a atividade proteolítica da bothropasina medidas como descrito no item 4.7.1. Foram formados *pools* com as frações de maiores atividades específicas das respectivas cromatografias que foram identificadas como DM40 e DM43, de acordo com os resultados obtidos por SDS-PAGE.

4.4 Obtenção de metaloproteases e serinoproteases mediante cromatografias de afinidade com inibidores

Sintetizaram-se duas resinas de afinidade como descrito nos itens 4.11 e 4.10. Com estas resinas foram realizadas duas cromatografias de afinidade, detalhadas a continuação:

4.4.1 Cromatografia de afinidade para metaloproteases

Foram montadas duas colunas com as resinas de afinidade sintetizadas com os inibidores de metaloproteases, DM40 e DM43. Em cada coluna (1 x 3 cm) aplicou-se veneno de *B. jararaca* com o objetivo de separar metaloproteases presentes no veneno como resultado da sua interação com os inibidores imobilizados nas resinas.

O processo cromatográfico realizou-se da seguinte maneira: A coluna foi equilibrada com tampão TBS (NaCl 50 mM – Tris HCl 20 mM, pH 8,1). Em 13 mL deste mesmo tampão dissolveram-se 13 mg de veneno de *B. jararaca*. A amostra foi centrifugada a 14,000 x g por 2 minutos e foi aplicada diretamente na coluna em volumes de 500 µL, até completar

a totalidade da amostra. Seguidamente continuou-se aplicando tampão TBS na coluna para lavar as proteínas que não ligaram. A seguir, realizou-se eluição das proteínas que ligaram na resina com NaCl 0,5 M, após da obtenção do pico proteico, foi realizada uma eluição final com guanidino HCl 3 M. Durante todo o processo cromatográfico foram coletadas manualmente frações de 500 µL a cada 3 minutos, e as absorbâncias das frações foram registradas manualmente a 280 nm.

A atividade proteolítica sobre o substrato de fluorescência apagada Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr foi realizada com as frações coletadas, seguindo o procedimento descrito no numeral 4.6.1.

4.4.2 Cromatografia de afinidade e exclusão molecular para serinoproteases

O peptídeo SFTI-1, previamente sintetizado como descrito no item 4.8, foi imobilizado sobre resina CM Sepharose FF. Com a resina de afinidade obtida foi montada uma coluna (0,6 x 2 cm) sobre a qual foi aplicado o veneno de *B. jararaca* com a finalidade de separar serinoproteases mediante a sua interação com o peptídeo.

O veneno de *B. jararaca*, 100 mg, foi dissolvido em 10 mL de tampão TBS (NaCl 50 mM – Tris HCl 20 mM, pH 8,1), e centrifugado a 16800 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi aplicado na coluna, 500 µL a cada 3 minutos, coletando-se frações de 1 mL. Seguidamente se fez lavagem com o mesmo tampão e uma eluição rápida com 10 mL de SSN, coletando também frações de 1 mL. A eluição final realizou-se com NaCl 0,5 M, coletando frações do mesmo volume. A absorbância das frações foi registrada a 280 nm. E avaliada a sua atividade proteolítica sobre o BApNA.

Formou-se um *pool* com as frações que hidrolisaram o BApNA e que foram eluídas da coluna de afinidade com NaCl 0,5 M. O *pool* obtido foi concentrado sob pressão de N_2 em câmara de ultrafiltração (Amicon®) até um volume de 600 µL, centrifugado a 16000

x g por 4 minutos e aplicado à coluna de Sephacryl S100 (0,9 x 79 cm), previamente equilibrada com tampão TBS (NaCl 50 mM – Tris HCl 20 mM, pH 7,2). O fraccionamento ocorreu em fluxo de 0,05 mL/min, coletaram-se frações de 500 µL e registrou-se a absorbância das frações de forma manual em 280 nm. Avaliou-se a atividade proteolítica das frações obtidas sobre o BApNA como descrito no item 4.6.2, e formaram-se cinco *pools* de serinoproteases segundo a atividade enzimática e o perfil eletroforético observado.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

As avaliações dos perfis eletroforéticos e/ou pureza das amostras foram realizadas por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (Laemmli 1970), em sistema Mini-Protean da Bio-Rad. As amostras, contendo 5-20 µg de proteína/10 µL de tampão Tris HCl 0,13M, pH 6,7, SDS 1% e β-mercaptoetanol 135 mM, foram incubadas em banho de água fervente por 5 minutos antes de aplicadas ao gel de 12% de poliacrilamida e corridas sob corrente constante de 12 mA. Após finalizar a corrida, os géis foram corados com solução de azul de Coomassie 0,25% em ácido acético:metanol:H_2O 1:5:5 por 10 minutos e, então, descorados com solução de metanol:ácido acético:H_2O 1:2:20 para revelar as bandas proteicas.

Para estimar a massa molecular das proteínas detectadas no gel corado, com base nas respectivas migrações relativas, foi corrido simultaneamente um padrão de massas moleculares da Thermo Scientific™, catálogo # 26610, com 7 proteínas cobrindo a faixa de massas moleculares de 14,4 a 116,0 kDa.

4.6 Avaliação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica de metaloproteases foi monitorada através da hidrólise de substratos peptídicos de fluorescência apagada e a de serinoproteases pela hidrólise do substrato cromogênico BApNA.

4.6.1 Hidrólise de substratos peptídicos de fluorescência apagada

A atividade proteolítica de metaloproteases foi medida em leitor de fluorescência em placa Enspire™, da Perkin Elmer, através da fluorescência produzida pelo produto de hidrólise do substrato Abz-GPQGLAGQ-NO_2-Tyr, ou de outros contendo o par fluoróforo/apagador Abz/NO_2-Tyr ou Abz/Eddn, sob as seguintes condições: em placas de 96 poços Optiplate™, de fundo plano e paredes opacas, as reações individuais nos poços foram feitas a 25°C num volume de 150 µL de tampão Tris HCl 50 mM, $CaCl_2$ 5 mM, pH 8,1, contendo 5-10 µM de substrato e a quantidade de enzima a ser avaliada. As fluorescências dos produtos formados em cada poço foram medidas a cada 3 minutos usando-se λ_{exc} de 320 nm e λ_{em} de 420 nm. A quantificação dos produtos formados em cada experimento foi estabelecida por comparação às fluorescências de 150 µL de soluções padronizadas contendo 300 pmol de Abz, distribuídas nos cantos da placa. Uma unidade de atividade proteolítica sobre substratos peptídicos de fluorescência apagada foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 pmol de Abz/minuto nas condições descritas acima, na presença de substrato 8,4 µM.

4.6.2 Hidrólise do BApNA

O método descrito por Alexander et al., (1988) foi adaptado para reações em placa de 96 poços para avaliação da atividade enzimática sobre o substrato BApNA. Reações individuais foram realizadas em placas transparentes de 96 poços Spectraplate™, de

fundo plano, em 150 µL de Tris HCl 50 mM, pH 8,1, contendo BApNA 600 µM e uma quantidade de amostra com a enzima a ser testada. As reações foram feitas a 25°C e monitoradas a cada minuto pela A_{405nm} em leitor de placas EnSpire™, da Perkin Elmer. A quantificação da p-nitroanilina produzida em cada reação enzimática foi feita por comparação da respectiva A_{405nm} com a de curva padrão de p-nitroanilina obtida na mesma placa de 96 poços. Uma unidade de atividade amidásica sobre o substrato BApNA foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar nmol pNA/minuto nas condições descritas.

4.7 Avaliação da inibição de atividade proteolítica

Os protocolos estabelecidos em itens anteriores para medidas das atividades de proteases foram modificados para permitir o estudo de inibição das atividades correspondentes por diferentes compostos. Experimentos de inibição foram realizados tanto para acompanhar os processos de purificação de inibidores naturais como para caracterização das interações entre enzimas e inibidores purificados.

4.7.1 Inibição da proteólise catalisada pela metaloprotease

Os testes de inibição da hidrólise de substratos peptídicos de fluorescência apagada pela bothropasina foram realizados pré-incubando-se a 37°C, por 10 minutos, 45 unidades de enzima com o inibidor num volume final de 50 µL de Tris HCl 50 mM, $CaCl_2$ 5 mM, pH 8,1. Em seguida, a reação enzimática foi iniciada por adição de 100 µL de solução de Abz-GPQGLAGQ-NO_2-Tyr para atingir concentração de 8.4 µM, acompanhando-se a formação de produtos como descrito no item 4.6.1. Uma unidade de atividade inibitória

foi definida como a quantidade de inibidor necessária para suprimir 1 unidade de bothropasina, nas condições descritas.

4.7.2 Inibição da atividade de serinoproteases

A hidrólise do BApNA ocorreu nos experimentos pela ação de serinoproteases, desta forma para avaliar a inibição sobre estas enzimas pelo inibidor SFTI-R, sintetizado como descrito no item 4.8, realizou-se a incubação a 37°C por 10 minutos da serinoproteases com o inibidor, cuidando de não exceder um volume de 50 µL, seguidamente este volume foi adicionado sobre os 100 µL de substrato previamente pipetados no poço da placa Spectraplate de 96 poços, executando o experimento sob as mesmas condições descritas na avaliação da atividade proteolítica sobre o BApNA no item 4.6.2.

4.8 Sínteses de peptídeos em fase sólida

Alguns dos peptídeos usados neste trabalho, como o substrato de fluorescência apagada Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr para se medir a atividade proteolítica de metaloproteases, foram sintetizados em fase solida utilizando-se a estratégia Fmoc (Fields e Noble 1990). O processo de síntese manual foi executado em reator de vidro de 2,5 x 15 cm, com fundo de placa porosa de vidro sinterizado, que permitia a adição de reagentes e solventes pela abertura superior, e eliminação de solventes e solutos por aspiração através da placa porosa. A síntese foi feita em escala de 100 µmol, em resina Rink amida, com todos os reagentes em excesso molar de 2,5 vezes relativamente à capacidade da resina de 0,7 mmol/g. A síntese ocorre do aminoácido C-terminal, o primeiro a ser ligado à resina, para o N-terminal, através de ciclos sucessivos de remoção do Fmoc e acoplamento do Fmoc-aminoácido seguinte na sequência. As etapas de

acoplamento dos Fmoc-aminoácidos e de remoção do grupo Fmoc durante as sínteses foram realizadas sob radiação microondas em equipamento comercial adaptado (Panasonic, mod. Piccolo, 25L), potência 80 W.

4.8.1 Lavagem da resina

A remoção de quaisquer resíduos e solventes foi efetuada, com a resina no reator, por 7 ciclos consecutivos de lavagem que se iniciam por adição de 1 mL de DMF ao reator, borbulhamento de N_2 para agitação da resina durante 1 minuto e, finalmente, aspiração total do líquido através da placa porosa.

4.8.2 Remoção do grupo Fmoc

A estratégia Fmoc de síntese de peptídeos requer que o grupo protetor Fmoc, ligado à função α-amino do aminoácido recém incorporado, seja removido para permitir elongamento da cadeia peptídica ligada à resina. As reações de desbloqueio foram realizadas em 3 etapas sucessivas com durações de 1, 3 e 7 minutos, cada uma envolvendo adição de 2,5 mL de piperidina 20% em DMF, borbulhamento de N_2 para agitação acompanhado de pulso de microondas de 1 minuto de duração, e aspiração da solução presente no reator para eliminar os produtos de reação. Após lavagem da resina, uma pequena amostra foi ensaiada para presença de amina primária por reação com 20 μL de TNBS 0,1% em metanol, em meio alcalinizado com 20 μL de DIPEA 1.2 M em DMF; o desenvolvimento de cor alaranjada na resina indicava sucesso na remoção do Fmoc. No caso de desbloqueio de Fmoc-Pro, teste análogo para amina secundária era realizado adicionando-se 20 μL de acetaldeído 2% em DMF à amostra de resina, seguido de 20 μL de p-cloranil 2% em DMF; aparecimento de cor azul intensa na resina indicava amina livre.

4.8.3 Acoplamento dos Fmoc aminoácidos

Após lavagem da resina para remoção total de piperidina, o Fmoc-aminoácido a ser introduzido na sequência, 250 µmol em 1 mL de DMSO 20% em MNP, foi acoplado ao peptídeo nascente na presença de 250 µmol de HOBt e 250 µmol de diisopropilcarbodiimida. Durante a reação de acoplamento, no reator, a resina recebeu 6 pulsos de microondas, de 2 minutos cada; não se verifica aquecimento significativo neste processo. O sucesso de acoplamento do Fmoc-aminoácido foi verificado pelas reações colorimétricas descritas no item anterior, pelo resultado negativo dos testes.

4.8.4 Clivagem dos peptídeos da resina

Terminadas as etapas de elongamento da cadeia, procedeu-se à clivagem do peptídeo da resina com remoção concomitante dos grupos protetores das cadeias laterais de alguns dos aminoácidos. Inicialmente, a resina foi extensivamente lavada com metanol, seca por aspiração e transferida do reator para tubo de ensaio. A clivagem foi efetuada por tratamento da resina por 2 horas, à temperatura ambiente, com 1,5 mL de solução contendo 88% de TFA, 4% de H_2O, 4% de TIS, 2% de anisol e 20 mg de DTT. O peptídeo livre foi recuperado por precipitação, gotejando-se a solução de clivagem sobre 15 mL de éter etilbutílico gelado. Após centrifugação por 5 minutos a 500 x g, o precipitado foi lavado 3 vezes com 15 mL de éter gelado e então seco em tubo aberto, em capela ventilada.

4.9 Espectrometria de massas

Espectrometria de massas foi usada na determinação de massas intactas das proteínas estudadas. Fragmentos trípticos das proteínas também foram obtidos para determinação de suas sequências.

4.9.1 Determinação de massa intacta

4.9.1.1 Crotaini

O novo inibidor de metaloproteases isolado a partir do soro de *C. d. terrificus* foi nomeado de crotaini. A análise deste foi realizada no equipamento MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker) utilizando o procedimento para análise de proteínas intactas estabelecido no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB IV) da Universidade de São Paulo (USP).

O procedimento consistiu na mistura de 0,5 µL da amostra (1ug/µL) com 0,5µL de uma solução de matriz: 2,5-DHB (20mg/mL) com α-CHCA (20mg/mL) em TA30 na proporção de 60:40. Finalmente 0,5 µL da mistura foi aplicado na placa GroundSteel para as amostras serem analisadas.

A aquisição dos dados foi realizada no modo linear com polaridade positiva, com os seguintes parâmetros: Ion Source 1 - 19.39 kV; Ion Source 2 - 17.57 kV; Lens - 8.99 kV; Pulsed Ion Extraction 440 ns; Mass Range 10– 60 kDa; Laser Frequency 500Hz; Detector Gain 10.0x; Shots accumulated: 200 shots.

4.9.1.2 Bothropasina, DM40 e DM43

As análises da metaloprotease bothropasina e dos inibidores de metaloproteases DM40 e DM43 foram realizadas no equipamento MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker) utilizando o procedimento para análise de proteínas intactas estabelecido no laboratório do Professor Pieter Dorrestein, no Collaborative Mass Spectrometry Innovation Center da Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences da Universidade de Califórnia em San Diego, UCSD.

O procedimento consistiu na mistura de 0,5 µL da amostra (1ug/µL) com 0.5µL de uma solução saturada de matriz: 2,5-DHB (20mg/mL) com α-CHCA (20mg/mL) ou Ácido sinapínico (20mg/mL) em TA50. Finalmente 0,5 µL da mistura foi aplicado na placa GroundSteel MALDI Plate para as amostras serem analisadas.

O espectrômetro foi calibrado com padrão de ovoalbumina e realizou-se a aquisição dos dados no modo linear com polaridade positiva, com os seguintes parâmetros: mass range 10-55KDa; detector gain linear : 100x/3200V; sample rate e digitizer settings: 4.00 GS/s; real time smoothing: high; baseline offset adjustment: -1.5%; analog offset: 49.3 mV; spectrometer ion source 1: 18.97 kV; ion source 2: 16.17 kV; lens: 7.5kV.

4.9.2 Sequenciamento de peptídeos trípticos

Os peptídeos trípticos do inibidor de metaloproteases do soro de cascavel, o crotaini, e dos inibidores do soro de gambá DM40 e DM43, foram obtidos e processados em colaborações estabelecidas com o laboratório do Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto sob supervisão do Professor Dr. José César Rosa, com o laboratório do Professor Vitor Faça, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP, e com o laboratório do Professor Pieter Dorrestein, na UCSD.

No laboratório do Professor Rosa foi seguido o protocolo abaixo detalhado para a obtenção e análise dos peptídeos trípticos do inibidor.

O inibidor em solução foi desnaturado por uma solução de ACN 50% em bicarbonato de amônio 0,1M pH 7,8. Em seguida, realizou-se redução pela adição de 5µL de DTT 45mM por 1h a 56ºC e alquilação pela adição de 5µL de solução de iodoacetamida 100mM por 1h em ambiente protegido da luz. Para a digestão com tripsina, diluiu-se a amostra 5x em bicarbonato de amônio 0,1M e adicionou-se a solução de tripsina (Promega) contendo

0,5µg/20µl em bicarbonato de amônio 0,1M e incubado a 37ºC por 24 horas. A reação foi interrompida pela adição de 5µL de ácido fórmico.

A solução da amostra tripsinizada foi então dessalinizada em micro-tip contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol, equilibrada com ácido fórmico a 0,2%. Carregou-se a amostra em micro-tip individual e dessalinizou-se com 3 x 100µL de ácido fórmico a 0,2% sendo eluída da resina com 30µL de solução de metanol a 60% em ácido fórmico 5%. Neste solvente a amostra tripsinizada e sem sal foi analisada em um espectrômetro de massa do tipo electrospray (ESI) quadrupolo-time of flight (Q-TOF Ultima, Waters).

A análise ocorreu utilizando-se um eletrospray do tipo nanoflow contendo um capilar de silica fundida de 20µm de diâmetro interno, mantido a 3,5 kVolts, 40 V no cone de entrada e a uma temperatura de 100ºC. A amostra foi infundida através de amostrador automático acoplado ao NanoAcquity HPLC a um fluxo de 300nL/min e os espectros de massa foram coletados na forma de *data dependent acquisition* (top 3) e processados com o *software* MassLynx v.4.1 (Waters, Manchester, UK).

Os espectros de massas obtidos foram introduzidos no programa MASCOT, Expasy, NCBI (OMSSA, Blast. www.matrixscience.com), para identificação de proteínas homólogas aos peptídeos trípticos sequenciados.

No laboratório do Professor Faça a tripsinização do inibidor e análise dos peptídeos obtidos foram realizadas segundo procedimento estabelecido no laboratório (Faça et al. 2014). Utilizando-se espectrometria de massas em modo positivo, em um espectrômetro XEVO TQ-S (Waters), e voltagem constante de ionização de 3,5 kv. Obtiveram-se as listas de picos das análises realizadas e analisaram-se utilizando o MASCOT.

No laboratório do Professor Pieter Dorrestein, os peptídeos tripsinizados secos foram resuspendidos em 50 µL de uma mistura 1:1 de ACN:água, sendo ambos solventes grau LCMS. A análise cromatográfica foi realizada no sistema UltiMate 3000 UPLC (Thermo Scientific), utilizando uma coluna Scherzo SM-C18 (Imtakt USA)(250 x 2 mm, 3 µm) e um espectrômetro de massas Maxis Q-TOF (Bruker Daltonics) equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI). A coluna foi equilibrada com 5% de solvente B (ACN, ácido fórmico 0,1%) por um minuto, seguido por um gradiente linear de 5 a 100% de B em 8 minutos, mantendo-se em 100% de B por dois minutos, e retornando a 5% de B em 0,5 minuto, com fluxo durante a corrida de 0,5 mL/min.

Os dados no espectrômetro foram adquiridos em modo positivo na faixa de 100 – 2000 m/z. Uma mistura de 10 mg/mL de sulfametazina, sulfametizolo, sulfacloropiridazina, sulfadimetoxina, amitriptilina, e cumarina foram analisadas no começo e final das corridas como controle de qualidade. A calibração externa foi realizada antes da coleta dos dados com ESI-Low Concentration Tuning Mix (Agilent technologies), e a calibração interna durante as corridas foi realizada com o Hexakis(1H,1H,2H-perfluoroethoxy)phosphazene (CAS 186817-57-2).

Os outros parâmetros para a aquisição dos dados foram: voltagem do capilar: 4500V; pressão do gás nebulizador (Nitrogênio): 2 bar; temperatura da fonte: 200°C, fluxo do gás seco: 9 L/min, taxa espectral: 3 Hz para MS1 e 10 Hz para MS2.

Os dados obtidos foram submetidos ao servidor ProteoSAFe do Center for Computational Mass Spectrometry da Universidade de Califórnia em San Diego (http://proteomics.ucsd.edu) e analisados com a ferramenta para busca e identificação de peptídeos MS-GF+ (Kim, Gupta e Pevzner 2008, Kim e Pevzner 2014).

O alinhamento múltiplo das sequências obtidas nas análises nos três laboratórios, foi realizada utilizando o BLAST (Altschul et al. 1998), ferramenta disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov.

4.10 Sínteses de resina de afinidade SFTI-R

A síntese de resina de afinidade com o peptídeo SFTI-R imobilizado, este sintetizado como descrito no item 4.8, foi feita seguindo-se o protocolo geral de acoplamento de aminas e carboxilatos com carbodiimidas desenvolvido por (Cuatrecasas 1970)

A resina CM Sepharose FF, 20 mL, foi lavada com NaCl 0,5 M em funil com placa porosa e, após retirada do excesso de líquido da resina por sucção, esta foi transferida para tubo "falcon" de 50 mL. A seguir, o acoplamento foi realizado adicionando-se à resina 18 mg do peptídeo SFTI-R dissolvidos em 20 mL de tampão MES 50 mM, pH 5,5 e 100 mg de CMC. Após 5 horas à temperatura ambiente, sob agitação suave, o pH da reação foi acertado para 5.5, deixando-se então a reação prosseguir durante a noite na geladeira. Após este período, incubou-se a resina por 24 horas com 20 mL de etanolamina 200 mM, pH 5,0, para bloqueio de grupos reativos remanescentes e, então, a resina foi lavada com 100 mL de SSN, seguido de 50 mL de NaCl 0,5 M, 50 mL de ácido acético 0,5 M, e uma lavagem final com SSN. A resina CM Sepharose FF-SFTI-R foi armazenada em SSN a 4°C até uso.

4.11 Síntese resina de afinidade derivatizadas com DM40 e DM43

A estratégia de síntese de resinas de afinidade com os inibidores DM40 e DM43 levou em consideração o fato destas glicoproteínas poderem gerar grupos aldeído por

oxidação com metaperiodato de sódio, para posterior acoplamento à agarose-hidrazida. As oxidações foram feitas separadamente como descrito por Eylar e Jeanloz (1962) dissolvendo-se 2 mg de cada proteína em 300 µL de NaCl 50 mM contendo $NaHCO_3$ 50 mM; em seguida, foram adicionados 7 µL de solução fresca de $NaIO_4$ 0,25 M e a mistura foi agitada suavemente, permitindo-se a reação ocorrer por 30 minutos ao abrigo da luz. Após este período, foram adicionados 10 mg de glicina e 7 µL de etileneglicol a cada amostra para consumir o excesso de periodato, agitando-as por 1 hora ao abrigo da luz. Finalizado este período, cada amostra foi passada por coluna 1 x 10 cm de Sephadex G25, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, coletando-se frações de 700 µL. As frações contendo cada proteína oxidada foram reunidas e mantidas sob refrigeração a 4°C.

A preparação da resina Sepharose-hidrazida, para acoplamento das proteínas oxidadas, consistiu na ligação de hidróxido de hidrazina à resina CM Sepharose mediante o protocolo para acoplamento de aminas a carboxilatos com carbodiimida (Cuatrecasas 1970). A 5 mL de resina adicionou-se solução de hidróxido de hidrazina 2 M, pH 5,0, e 100 mg de EDC, deixando-se a reação ocorrer durante a noite à temperatura ambiente, sob agitação rotatória suave. Após lavagem com SSN da resina Sepharose-hidrazida formada, alíquotas de 2 mL foram incubadas por 24 horas, na geladeira, com cada uma das proteínas oxidadas, obtidas como descrito acima, para acoplamento via ligação hidrazona. As resinas foram então lavadas e armazenadas com SSN.

4.12 Ressonância plasmônica de superfície (SPR)

Os experimentos de ressonância plasmônica de superfície foram realizados no equipamento Biacore T200, da GE Healthcare Life Sciences. Para as imobilizações foram

usados chips CM5, da série S, que apresentam grupos carboxílicos disponíveis para acoplamento covalente. Todas as soluções de reagentes usados nos acoplamentos foram adquiridas do provedor do equipamento e os procedimentos usados foram feitos automaticamente pelo instrumento Biacore, seguindo programas pré-estabelecidos para ligação de aminas presentes em peptídeos ou proteínas. Brevemente, os grupos carboxílicos do chip CM5 foram ativados com EDC + NHS, formando o intermediário reativo éster de NHS que, após lavagem com HBS-N, reagia prontamente com aminas dissolvidas em HBS-N. Este procedimento direto foi usado na preparação de chips com o crotaini e com o peptídeo SFTI-R, introduzido pelo equipamento para reação na concentração de 5 mM, e com o inibidor crotaini, oferecido na concentração de 0,25 mM. Nas células-controle do chip foram ligados substâncias análogas, peptídeos ou proteínas, não relacionadas aos ligantes em estudo.

Por outro lado, o caráter ácido dos inibidores DM40 e DM43 impunha restrições para que fossem ligados diretamente ao chip ativado por NHS usando as condições padronizadas do Biacore. Para contornar esta dificuldade metodológica, estes inibidores foram imobilizados ao chip via ponte de avidina. Brevemente, amostras de ovalbumina e dos inibidores, todos de natureza glicoproteica, foram oxidados com metaperiodato de sódio como descrito no item 4.11 e, em seguida, derivatizadas com biotinil-hidrazida, em reações análogas à descrita acima para preparação das resinas Sepharose-DM40 e Sepharose-DM43, via formação de hidrazona. Sobre a superfície do chip ativada com EDC e NHS, após lavagem, foi passada avidina em solução 1 mg/mL em HBS-N. Após ligação da avidina, cada um dos inibidores biotinilados foram imobilizados ao chip revestido com avidina. Nestes casos, as células-controle do chip foram preparadas com ovoalbumina biotinilada como última camada.

5. RESULTADOS

5.1 Purificação da metaloprotease Bothropasina

O processo de purificação da bothropasina está mostrado na figura 1. Inicialmente, veneno da *B. jararaca* foi submetido à cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose FF, obtendo-se um perfil cromatográfico com múltiplos picos. A atividade proteolítica das frações sobre o substrato fluorogênico Abz-GPQGLAGQ-NO_2-Tyr foi testada, levando à formação de um *pool* com as frações que apresentaram a maior atividade. Este *pool* foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S200, avaliando-se novamente a atividade proteolítica das frações coletadas e formando-se um *pool* que foi recromatografado na mesma coluna de Sephacryl S200. Finalmente, baseando-se na atividade proteolítica e no perfil eletroforético em SDS-PAGE das frações, foi formado o *pool* correspondente à metaloprotease isolada do veneno da *B. jararaca*, posteriormente identificada como a bothropasina. Esta preparação enzimática foi usada ao longo do presente trabalho. Os dados relativos ao processo de purificação estão apresentados na tabela 1.

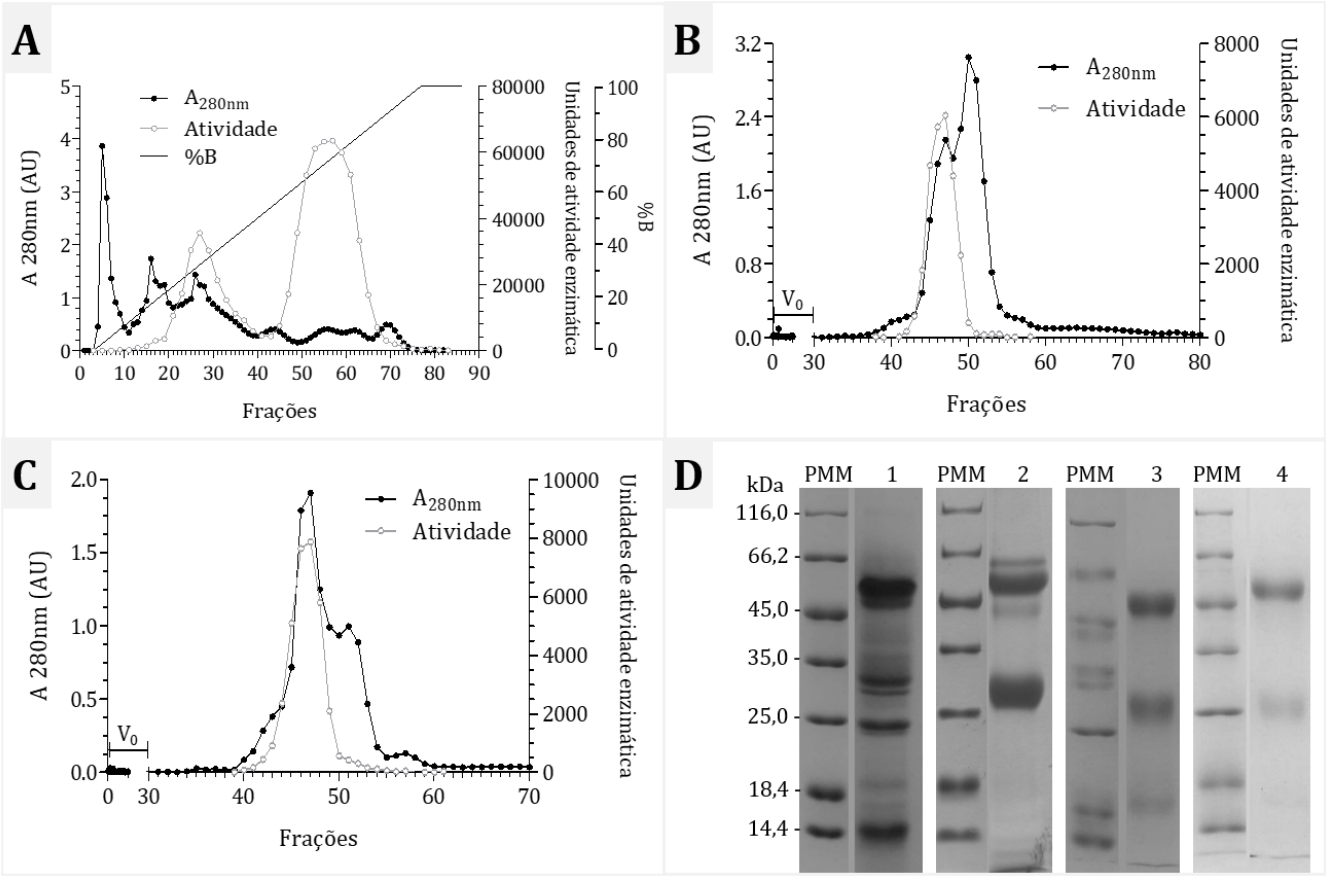

Figura 1. Isolamento da bothropasina a partir do veneno da *B. jararaca*. O veneno seco de *B. jararaca*, 430 mg, foi dissolvido em 12 mL de solução salina e equilibrado em tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5, antes de ser fracionado por troca iônica (A) em coluna DEAE Sepharose FF de 1,4 x 30 cm. A eluição dos componentes do veneno foi efetuada pela passagem de 10 volumes de coluna de gradiente linear de concentração de NaCl formado a partir do tampão de equilíbrio Tris HCl 50 mM, pH 7,5, e solução B, tampão de equilíbrio contendo 400 mM de NaCl. Frações de 5 mL foram coletadas a fluxo de 2 mL/min, registrando-se a absorbância em 280 nm. As frações 49-65, com atividade proteolítica, foram reunidas em um *pool* que foi submetido à cromatografia de exclusão molecular (B) em coluna de Sephacryl S200 (0,9 x 77 cm), equilibrada e percolada com tampão bicarbonato de amônio 10 mM, pH 8,1. A absorbância das frações (0,5 mL) coletadas a fluxo de 0,05 mL/min foi registrada a 280 nm. Um *pool* das frações 43-48 foi reunido considerando-se atividade proteolítica e perfil eletroforético, que foi submetido mais uma vez à cromatografia de exclusão molecular (C) sob as mesmas condições utilizadas anteriormente. Atividade proteolítica e perfil eletroforético das frações foram avaliados e foi formado um *pool* das frações 45 a 48 que corresponde à bothropasina. Durante o processo de isolamento o perfil eletroforético foi analisado por SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie (D), utilizando-se um padrão de massas moleculares (PMM) em cada gel e carregando-se na linha 1: o veneno da jararaca sem fracionar; na linha 2: o *pool* formado após o fracionamento na DEAE Sepharose; na linha 3: o *pool* obtido após a primeira exclusão molecular; na linha 4: a metaloprotease obtida após a recromatografia em Sephacryl S200.

Tabela 1. Sumário do processo de purificação da bothropasina

Etapa purificação	Proteína total[a] (mg)	Atividade (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Veneno *B. jararaca*	554,5	2860728	5159	100,0	---
DEAE Sepharose FF	73,0	346602	4746	12,1	0,9
Sephacryl™ S200	5,8	64072	11128	2,2	2,2
Sephacryl™ S200 (Recromatografia)	3,4	49023	14490	1,7	2,8

[a]. Concentração de proteínas determinada pela absorbância a 280nm.

5.2 Purificação do inibidor de metaloproteases do soro de *C. d. terrificus*.

Um inibidor de metaloproteases presente no soro de *C. d. terrificus* foi purificado cromatograficamente como mostrado na figura 2, quando se avaliou a capacidade de cada fração obtida em inibir a atividade proteolítica da bothropasina sobre o substrato fluorogênico Abz-GPQGLAGQ-NO_2-Tyr.

No primeiro passo da purificação o soro da *C. d. terrificus* foi fracionado por cromatografia de troca aniônica fraca em resina DEAE Sepharose, tendo-se reunido as frações que inibiram a atividade proteolítica da bothropasina em um *pool*. No passo seguinte de purificação este material ativo foi submetido à troca aniônica forte em coluna MonoQ, reunindo-se as frações com atividade de inibição sobre a metaloprotease em um *pool* considerando-se também os respectivos perfis eletroforéticos. O passo final da purificação consistiu no fracionamento deste material ativo por HPLC em coluna de fase

reversa para proteínas Pro-RPC™, obtendo-se alto grau de purificação do inibidor de metaloproteases, então denominado "crotaini", que foi utilizado nos experimentos de inibição e interação com a bothropasina ao longo deste trabalho. Os dados da tabela 2 resumem o processo de purificação do inibidor.

Tabela 2. Resumo do processo de purificação do crotaini

Etapa purificação	Proteína total[a] (mg)	Atividade (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Soro *C. d. terrificus*	130,3	2759649	21179	100,0	---
DEAE Sepharose FF	11,9	175132	14751	6,3	0,7
MonoQ™ 5/50	4,3	70243	16185	2,5	0,8
Pro-RPC™ HPLC	0,8	35155	44480	1,3	2,1

[a]. Concentração de proteínas determinada pela absorbância a 280nm.

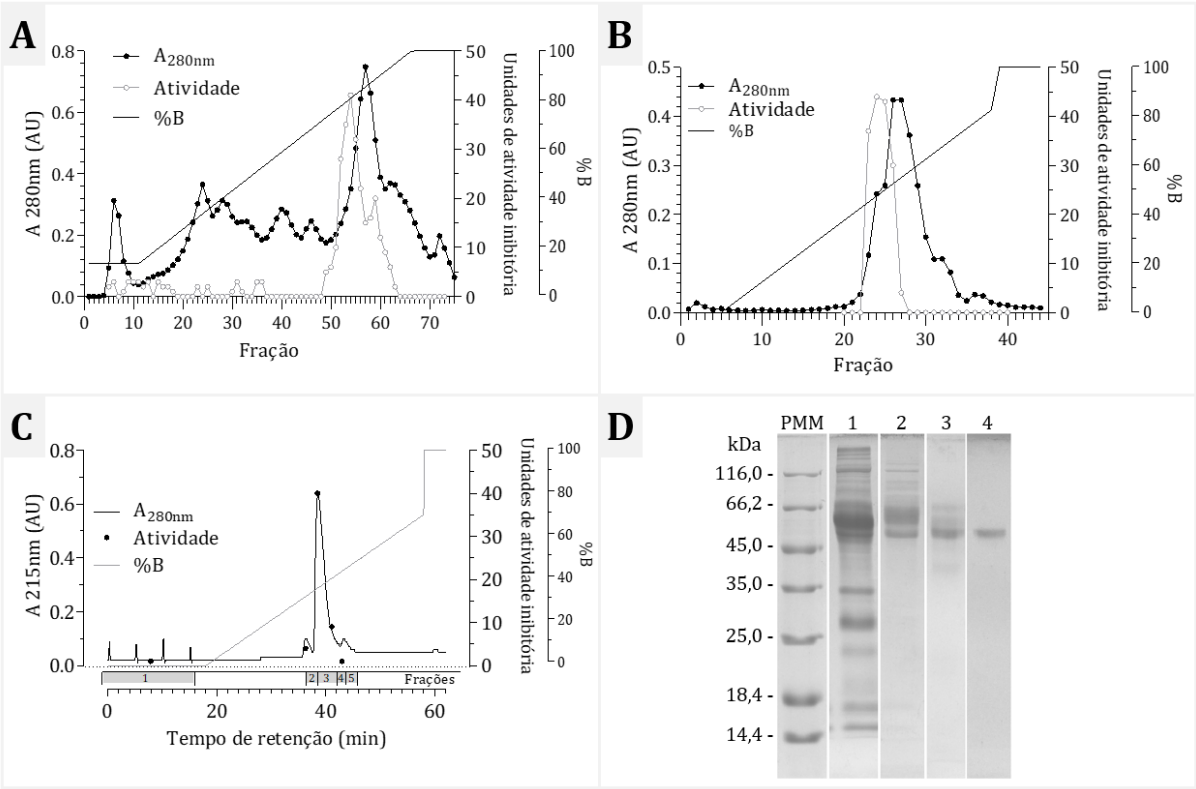

Figura 2. Purificação de inibidor de metaloprotease do soro da *C. d. terrificus.* O soro da *C. d. terrificus* foi fracionado por cromatografia de troca iônica (A) em coluna de resina DEAE Sepharose FF (0,63 x 35 cm). O soro foi misturado com tampão Tris HCl 20 mM, NaCl 40 mM, pH 8,1 e aplicado diretamente na coluna, que foi previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi realizada com gradiente linear em fluxo de 0,25 mL/min com tampão Tris HCl 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8,1 (tampão B), coletando-se frações de 1,7 mL e registrando-se a absorbância em 280 nm. Foram consideradas frações ativas as frações que inibiram a atividade proteolítica da metaloprotease, com as quais se formou um *pool* que foi equilibrado com tampão Tris HCl 20 mM, NaCl 40 mM, pH 8,1 e submetido à cromatografia de troca iônica (B) em coluna MonoQ (0,5 x 5 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição das frações (0,6 mL) foi realizada com fluxo de 1,2 mL/min em gradiente linear com tampão B: Tris HCl 20 mM, NaCl 800 mM, pH 8,1 e as respectivas A_{280nm} registradas. Com as frações que inibiram a atividade proteolítica da metaloprotease foi formado um *pool*, que foi finalmente fracionado em cromatografia de fase reversa em HPLC (C) em coluna Pro-RPC (0,5 x 10 cm), equilibrada com tampão TFA 0,1% - ACN 5%, e eluída com tampão TFA 0,1% - ACN 60% (tampão B) em gradiente linear e fluxo de 0,5 mL/min. As frações foram coletadas segundo a A_{215nm} medida em tempo real no efluente. A fração de maior absorbância apresentou também a maior concentração de atividade inibitória e banda única quando analisada por SDS-PAGE ao 12% (D, linha 4); esta proteína foi denominada "crotaini". Nas linhas 1, 2 e 3 em D são mostrados os perfis eletroforéticos do soro, do *pool* obtido em A e do *pool* obtido em C, respetivamente.

5.3 Isolamento dos inibidores de metaloproteases DM40 e DM43 do soro de *Didelphis marsupialis*.

O processo de purificação cromatográfica dos inibidores DM40 e DM43 do soro de *D. marsupialis* foi efetuado como descrito no item 4.3. Os resultados estão apresentados na figura 3. A tabela 3 apresenta os dados quantitativos de recuperação proteica e de atividade das etapas envolvidas no referido processo de purificação.

Tabela 3. Resumo do processo de purificação dos inibidores DM40 e DM43

Etapa purificação	Proteína total[a] (mg)	Atividade (U)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
DM40					
Soro *D. marsupialis*	1363,3	3837422	2815	100,0	---
DEAE Sepharose FF	71,5	653380	9138	17,0	3,2
Phenyl Sepharose CL 4B	7,5	108238	14520	2,8	5,.2
DM43					
Soro *D. marsupialis*	1363,3	3837422	2815	100,0	---
DEAE Sepharose FF	36,8	667938	18142	17,4	6,4
Phenyl Sepharose CL 4B	7,5	140912	18826	3,7	6,7

[a]. Concentração de proteínas determinada pela absorbância a 280nm.

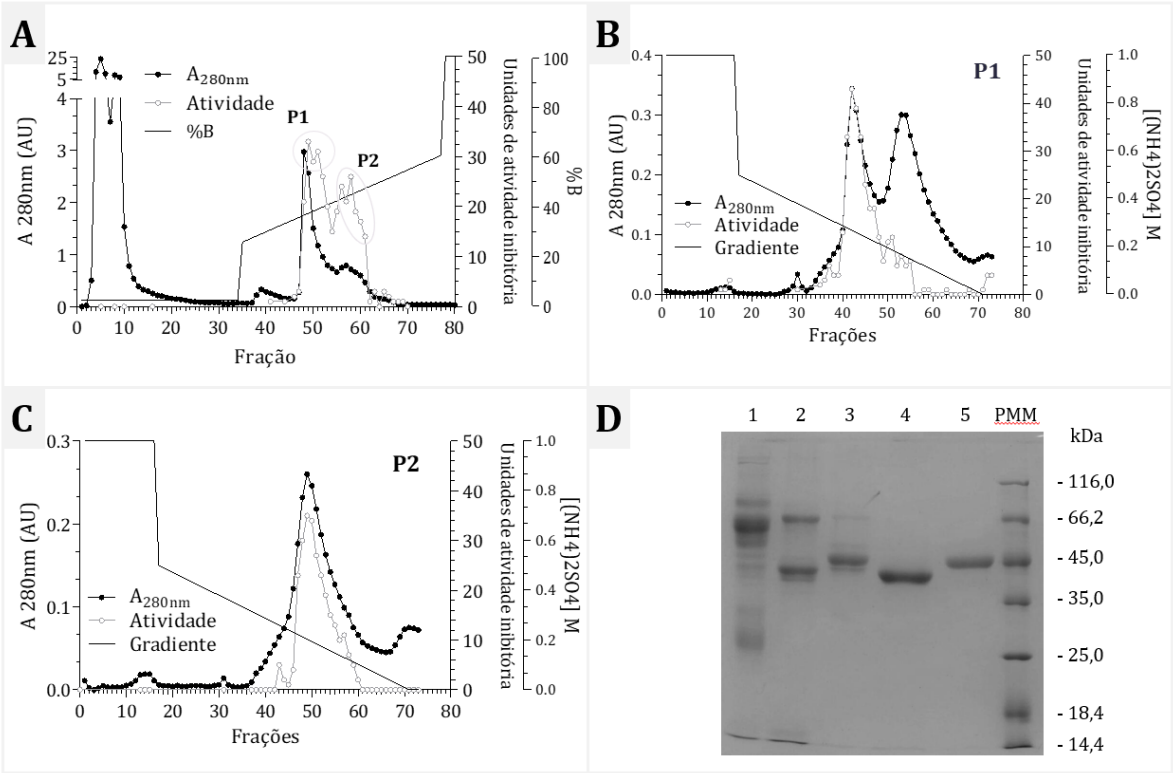

Figura 3. Purificação dos inibidores de metaloproteases DM40 e DM43 do soro de *D. marsupialis*. O processo foi iniciado com 11 mL de soro de *D. marsupialis*, equilibrado por diálise com acetato de sódio 50 mM, NaCl 10 mM, pH 4,0, e cromatografado por troca iônica (A) em coluna DEAE Sepharose FF (1,4 x 30 cm). Frações de 7 mL foram coletadas a fluxo de 2 mL/min, registrando-se a absorbância em 280 nm. As frações 49-51 e 56-61, que inibiram a atividade proteolítica da bothropasina, foram reunidas nos *pools* P1 e P2. Detalhes do processo estão descritos no item 4.3.1. Em seguida, cada *pool* foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica (B, C) em coluna de Phenyl Sepharose CL 4B (1,6 x 20 cm); frações de 3 mL foram coletadas sob fluxo de 0,5 mL/min, medindo-se as respectivas A_{280nm} e atividades anti-proteolíticas, e revelando-se os perfis eletroforéticos. Detalhes do processo cromatográfico estão descritos no item 4.3.2, que permitiram a formação de um *pool* das frações 40-45 para P1 (B), e das frações 47-54 para P2 (C), correspondendo aos inibidores DM40 e DM43, respectivamente. Os perfis eletroforéticos obtidos por SDS-PAGE 12% correspondem: PMM, padrão de massas moleculares; linha 1-soro do *D. marsupialis*; linha 2- *pool* P1 da cromatografia em DEAE-Sepharose; linha 3- *pool* P2 da cromatografia em DEAE-Sepharose; linhas 4- e 5- DM40 e DM43, respectivamente.

5.4 Determinação da massa molecular

As massas moleculares das proteínas relevantes para este trabalho foram determinadas tanto por SDS-PAGE quanto por espectrometria de massas.

5.4.1 Caracterização da bothropasina e de inibidores de metaloproteases por SDS-PAGE

Os perfis eletroforéticos da bothropasina e de três inibidores de proteases, obtidos com preparações destas proteínas purificadas, estão mostrados na figura 4. As massas moleculares das proteínas purificadas foram estimadas por comparação das respectivas migrações eletroforéticas com às das proteínas do PMM.

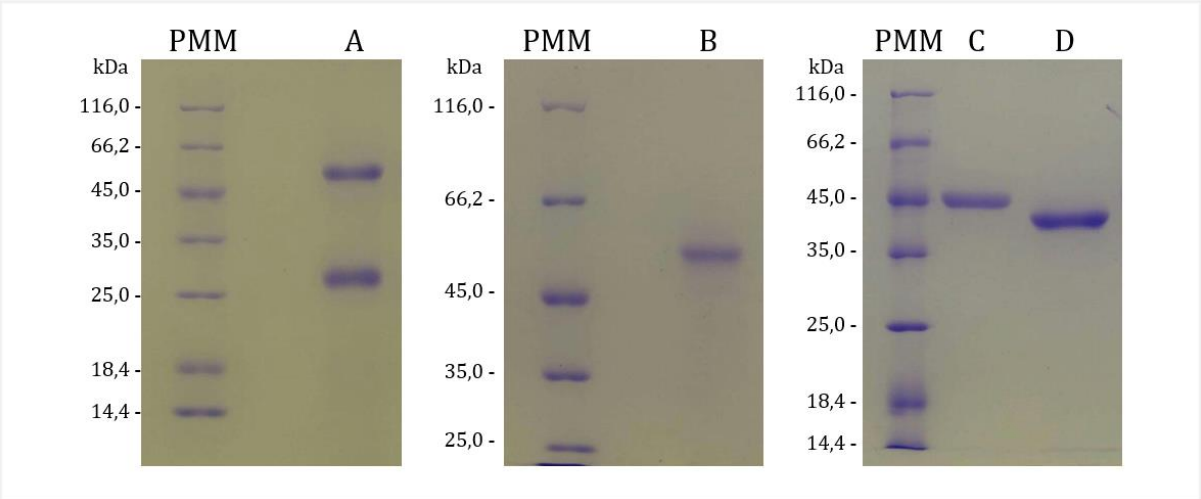

Figura 4. Determinação de massa molecular relativa por eletroforese em SDS-PAGE. Amostras das preparações purificadas da bothropasina (A), do inibidor crotaini (B) e dos inibidores DM43 (C) e DM40 (D) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturante e redutora. Após as corridas, os géis foram corados com azul de Coomassie e as massas moleculares relativas das proteínas determinadas segundo suas migrações em comparação com as das proteínas do PMM; A: 54,6 e 28,1 kDa; B: 54,2 kDa; C: 41,1 kDa; D: 44,6 kDa.

O perfil eletroforético da bothropasina, de Mr 54,6 kDa, mostra um contaminante de Mr 28,1 kDa que, em diferentes preparações da metaloprotease, foi encontrado em

proporções distintas da mostrada na figura 4A, como se observa na figura 1D. As proporções relativas aproximadas destas duas proteínas nas diferentes preparações foram avaliadas usando-se o programa Image J (https://imagej.nih.gov/ij/). Os perfis eletroforéticos dos inibidores crotaini (figura 4B), DM40 (figura 4C) e DM43 (figura 4D) indicaram alto grau de purezas alcançados nas preparações, estimando-se as respectivas massas moleculares em 52,4 kDa, 41,1 kDa e 44,6 kDa.

5.4.2 Caracterização da bothropasina e de inibidores de metaloproteases por espectrometria de massas

As massas moleculares da bothropasina e dos inibidores crotaini, DM40 e DM 43 foram também determinadas por espectrometria de massas em MALDI-TOF/TOF, em modo linear positivo. A massa determinada por este método para a bothropasina foi de 48,943 Da, verificando-se no espectro mostrado na figura 5 os picos correspondentes à proteína com carga simples (48,944 m/z $(M+H)^{+}$) e carga dupla (22,967 m/z $(M+H)^{+2}$). A massa determinada para o crotaini a partir do espectro obtido (figura 6) foi 45,930 Da, observando-se no espectro os picos com m/z de 45,931 $(M+H)^{+1}$ e 22,993 $(M+H)^{+2}$. A massa determinada para o inibidor DM40 segundo o espectro obtido (figura 7) foi 40,001 Da, observando no espectro os valores de m/z de 40,002 $(M+H)^{+1}$ e 19,954 $(M+H)^{+2}$. A figura 8 apresenta o espectro obtido para o inibidor DM43, em que são observados os picos de m/z 42,637 $(M+H)^{+1}$ e 21,214 $(M+H)^{+2}$, a partir dos quais se determinou a massa de 42,636 Da para o inibidor.

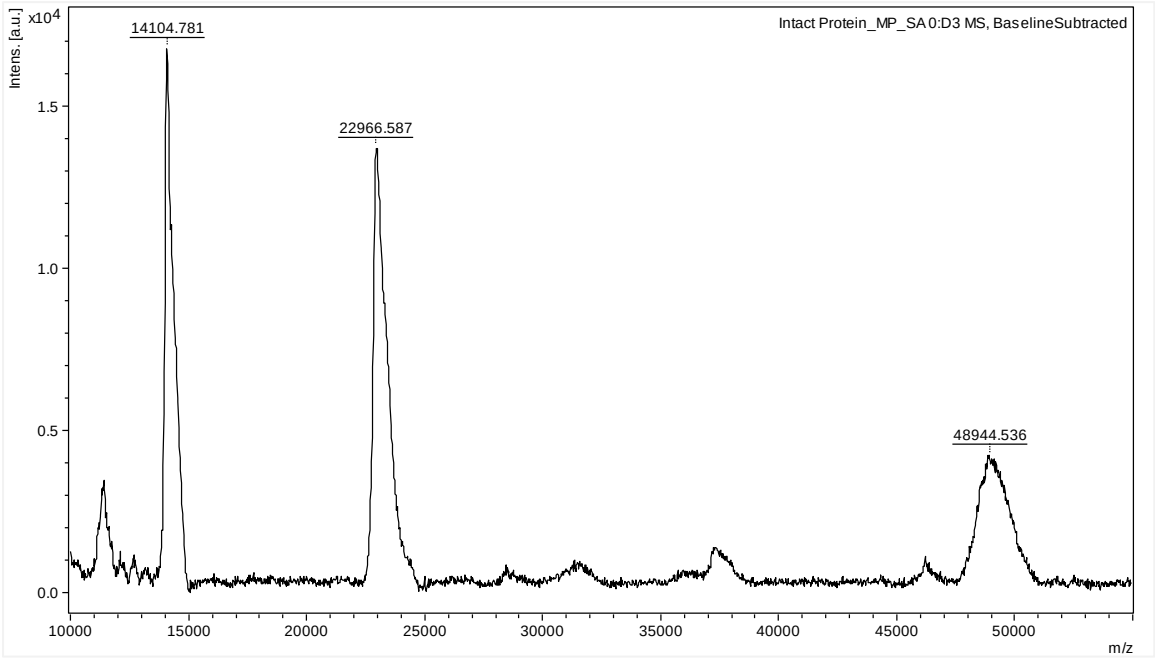

Figura 5. Espectro de massas da bothropasina. Análise da bothropasina $(M+H)^+$ obtido por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF em modo linear positivo, com matriz de ácido sinapínico.

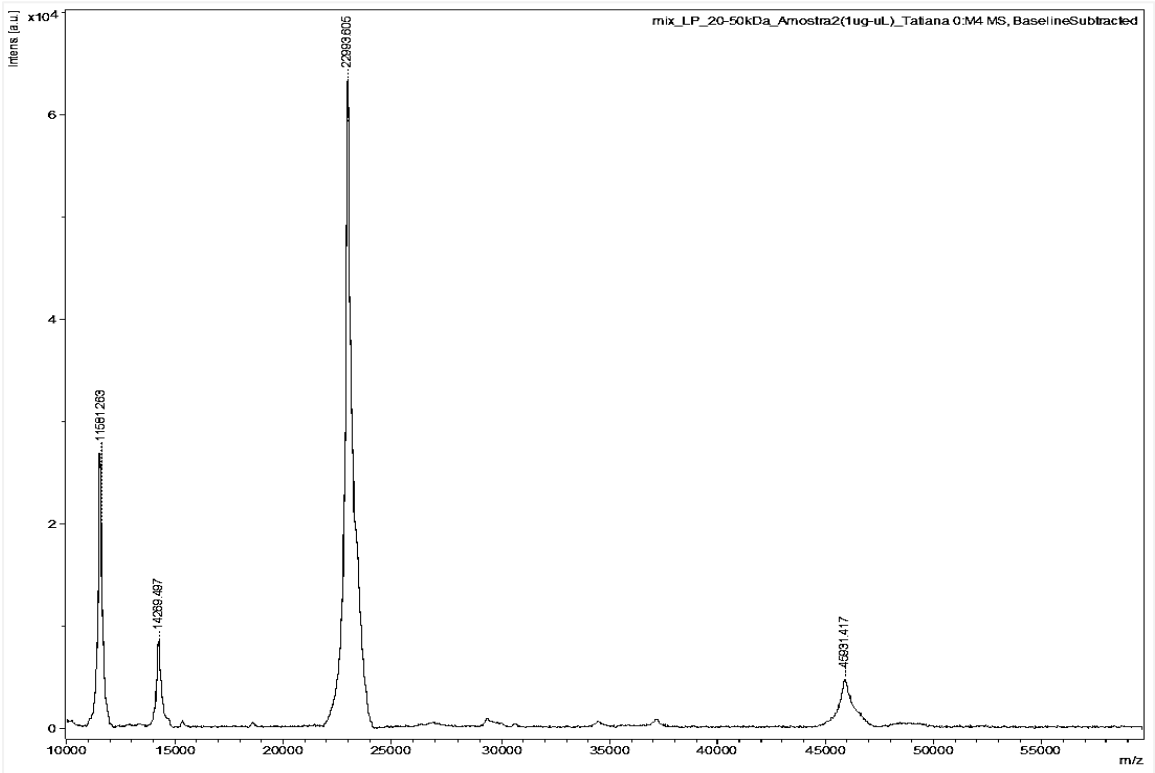

Figura 6. Espectro de massas do crotaini. Análise do inibidor de metaloproteases, crotaini, $(M+H)^+$, obtido por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF em modo linear positivo, com matriz de 2,5-DHB/α-CHCA.

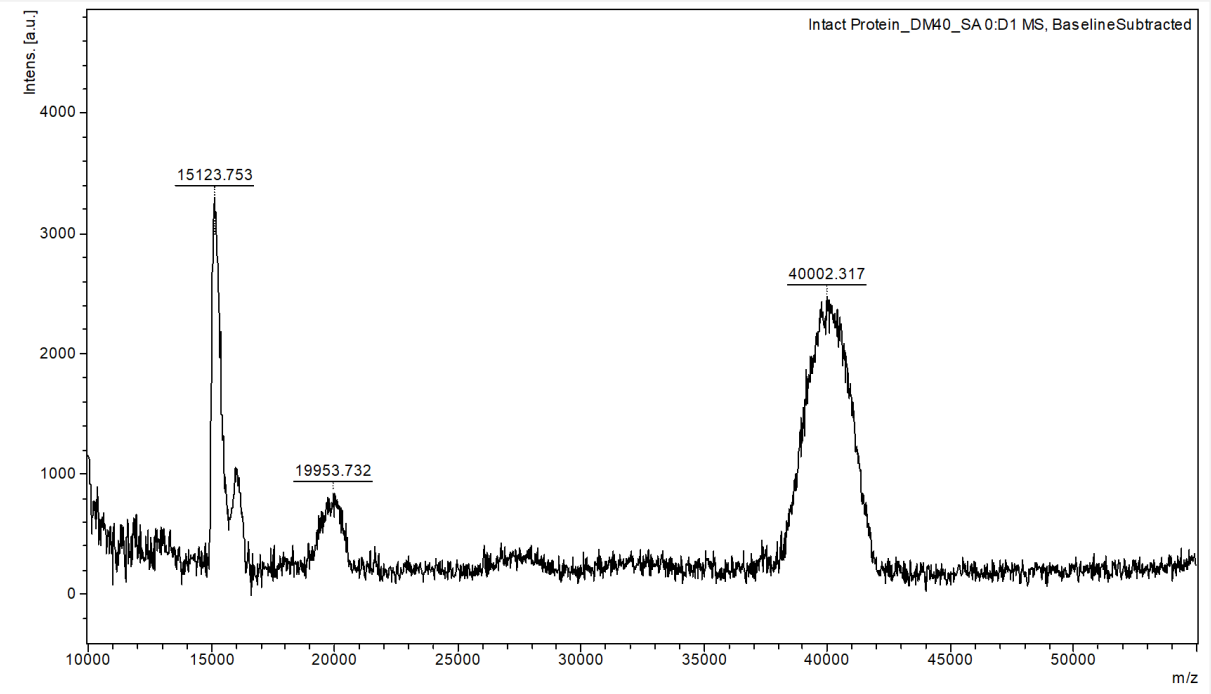

Figura 8. Espectro de massas do DM40. Análise do inibidor DM40 $(M+H)^+$ obtido por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF em modo linear positivo, com matriz de ácido sinapínico.

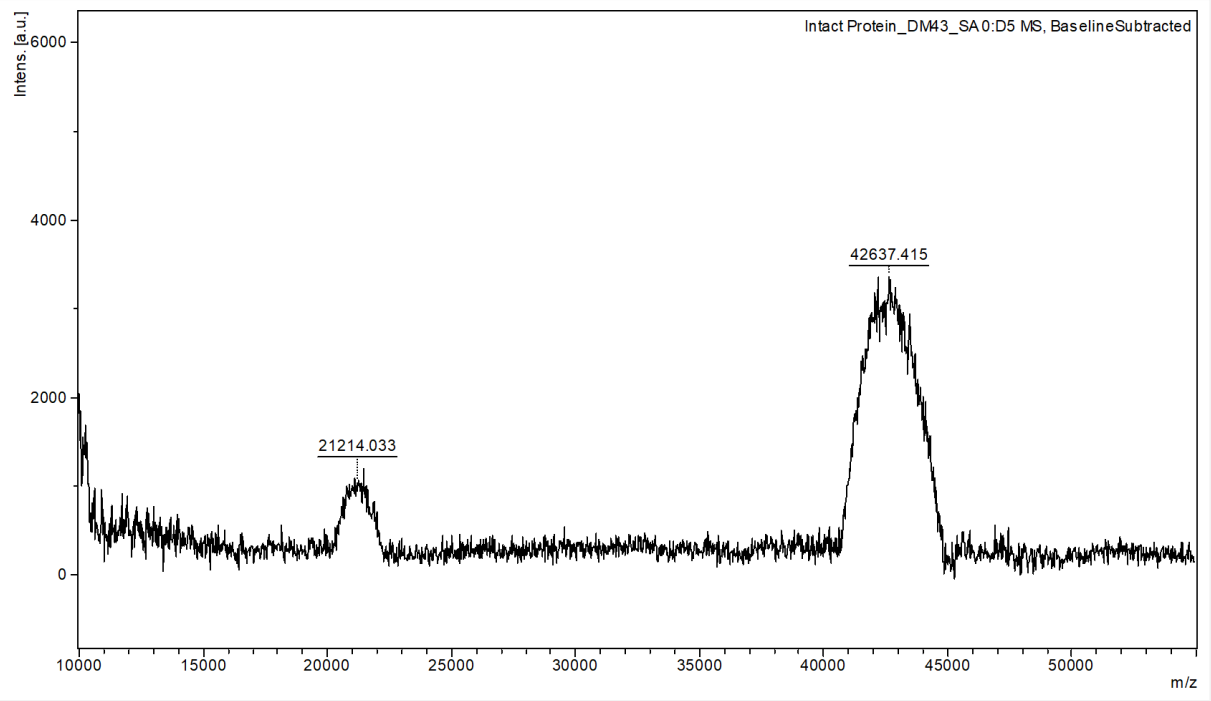

Figura 7. Espectro de massas do DM43. Análise do inibidor DM43 $(M+H)^+$ obtido por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF em modo linear positivo, com matriz de ácido sinapínico.

5.5 Caracterização das proteínas bothropasina, crotaini, DM40 e DM43 por sequenciamento dos respectivos fragmentos trípticos.

As listas de picos dos espectros de massas dos fragmentos trípticos das proteínas de interesse neste estudo foram analisadas utilizando-se dois servidores: o MASCOT (Matrix Science), utilizando SwissProt como base de dados de referência, ou o ProteoSAFe (UCSD Proteomics), utilizando a base de dados do próprio servidor. Com os dados obtidos em ambos servidores foi possível verificar similaridades estruturais destes peptídeos com proteínas já caracterizadas. Na tabela 4 estão apresentadas as sequências dos peptídeos identificados para cada uma das proteínas analisadas.

O alinhamento dos peptídeos sequenciados foi realizado utilizando-se a ferramenta para alinhamento múltiplo BLAST (Altschul et al. 1998), em relação a sequências depositadas no banco de dados do NCBI; (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Na figura 9, observa-se o alinhamento dos fragmentos isolados do crotaini com sequências de outros inibidores conhecidos isolados do soro de serpentes pertencentes à família *Viperidae*, a da *C. d. terrificus*. As proteínas cHLP-A e cHLP-B são fatores anti-hemorrágicos que foram isolados do soro da serpente chinesa *Gloydius brevicaudus* (Aoki et al. 2009), com códigos de identificação (ID) nas bases de dados de Q5KQS3 e Q5KQS2, respectivamente. O HSF é um fator anti-hemorrágico isolado do soro da serpente *Protobothrops flavoviridis* (Omori-Satoh et al. 1972), ID: P29695. O inibidor de metaloproteases BJ46a (ID: Q9DGI0) é um fator anti-hemorrágico isolado de *B. jararaca* (Valente et al. 2001) e BaltMPI, isolado do soro de *B. alternatus* (Palacio et al. 2017).

Tabela 4. Peptídeos trípticos e sequenciados da bothropasina e dos inibidores crotaini, DM40 e DM43

Proteína	Sequência	Massa relativa (calculada)	Carga	m/z
Crotaini	K.GTKDWADIGVR.Y[a]	1216.62	2	609.35
	K.CHSTPDSVENVR.R[b]	1383.6	2	692.64
	K.LSGHVYEVLEISR.G[abc]	1500.79	2	751.43
	R.IIHDIATFEDEVFVK.C[ac]	1774.91	3	592.68
	K.CPILLPPNDPHVVDSVEYVLNK.H[ab]	2527.29	3	840.15
	K.CPILLPPNDPHVVDSVEYVLNKHNEK.L[a]	3025.53	4	757.43
	R.SHASLEKPK.D[c]	995.55	3	332.85
	L.NKHNEKLSGHVYEVLEISR.G[c]	2251.17	3	751.39
Bothropasina[d]	R.YLYMHAALVGLEIWSNGDK.I[c]	2179.08	2	1090.54
	R.SVAIVEDYSPINLVVAVIMAHEMGH.N[c]	2693.36	3	898.79
	R.MYELANIVNEILR.Y[c]	1576.84	2	789.42
	H.AALVGLEIWSNGDK.I[c]	1471.77	2	736.89
	R.SVAIVEDYSPINLVVAVIMAH.E[c]	2239.20	3	747.40
	K.MFYSNDDEHK.G[c]	1284.52	2	643.26
	K.ITVKPDVDYTLNSFAEWR.K[c]	2153.09	2	1077.54
	K.MFYSNDDEHKGMVLPGTK.C[c]	2067.95	3	690.32
	K.HDNAQLLTAIDFNGPTIGY.A[c]	2059.01	2	1030.50
	K.ITVKPDVDYTLN.S[c]	1376.73	2	689.36
	R.SVGIVQDYSPINLVVAVIMAH.E[c]	2224.20	2	1113.10
	R.MYELANIVNEIFR.Y[c]	1611.82	2	806.91
DM40[d]	M.IFDLYQEGEQEPVK.S[c]	1693.83	2	847.91
	R.GMLLGMIFDLYQEGEQEPVK.S[c]	2296.12	2	1149.06
	K.DGELLSTLPVVGLVGK.F[c]	1595.92	2	798.96
	K.VQVDQTGGEALGR.M[c]	1328.68	2	665.34
	K.FLASVSTVLTSK.Y[c]	1252.71	2	627.36
	R.LVVYPWTTR.F[c]	1265.67	2	633.84
	K.DFTPEIHASMDK.F[c]	1390.63	3	464.54
DM43[d]	R.ILTSENDWTPLSAPVEVTGK.E[c]	2156.11	2	1079.05
	R.GMLLGMIFDLYQEGEQEPVK.S[c]	2312.11	2	1157.06
	R.NGPPIWSEDSNVLELDLSTGQ.-[c]	2085.00	2	1043.50
	K.EPLPAPSLHAEPGPWILPGLETK.L[c]	2448.31	3	817.10
	K.DGQETPVEVVPISDPMK.V[c]	1855.89	2	928.95
	K.LFKDGQETPVEVVPISDPMK.V[c]	2228.15	3	743.72
	K.ANFYILNDRDFRPGDIVTF.S[c]	2271.13	3	758.04
	M.IFDLYQEGEQEPVK.S[c]	1693.83	2	847.91
	K.DGELLSTLPVVGLVGK.F[c]	1595.92	2	798.96
	K.DGQETPVEVVPISD.P[c]	1483.71	2	742.86

[a,b,c]. Dados obtidos em colaborações com Dr. J. C. Rosa[a], Dr. V. Faça[b] e Dr. P. Dorrestein[c].

[d]. As denominações bothropasina, DM40 e DM43 foram atribuídas às proteínas com base nos alinhamentos de sequência, mostrados nas figuras 11 e 12, dos respectivos fragmentos trípticos com dados de proteínas depositados no banco de sequências do NCBI.

```
CrotaIni     1    ------------------------------KGTKDWADIGVRY-------------------------------------  80
cHLP-A            MNSLVALVLLGQIIGSTLSFQLGPNMDCNTKGTKDWADIGVRYINEHKLDGYKNALNIIKIFRLLPSDGRSVIVHFKLNL
HSF               MNSLVALVLLGQIIGSTLSSQVRGDLECDDKEAKNWADDAVRYINEHKLHGHKQALNVIKNICVVPWNGDLVAVFLELNL
BJ46a             MNSLVALVLLGQIIGSTLSSQVRGDLECDEKDAKEWTDTGVRYINEHKLHGYKYALNVIKNIVVVPWDGDWVAVFLKLNL
cHLP-B            MNSLVALVLLGQMIGSTLSHHLQSHVDCNGEDAEKWADMAVHYINEHNLHGYKQVFNVINEIHVLPRRPRGKIIILELKL
BaltMPI           -------------------SQVRGDLECDEKDAKEWTDIGVRYINEHKLHGYKYALNVIKNIVDVPWDGDWVAVFLKLNL

CrotaIni     81   --------------------------------RIIHDIATFEDEVFVKCHSTPDSVENVRR---KCPILLPPNDPHVVDS  160
cHLP-A            LETKCHVLDPTPVENCAVRQQHNHAVEMDCNVRIIHDIATFEDEVFVKCKSTPDSVENVRRNCPKCPILLPPNDPHVVDS
HSF               LETECHVLDPTPVEKCTVRQQHNHAVEMDCDAKIMFNVETFKRDVFVKCHSTPDSVENVRRNCSKCPILLPPNNPHVVDS
BJ46a             LETECHVLDPTPVKNCTVRPQHNHAVEMDCDVKIMFNVDTFKEDVFAKCHSTPDSVENVRRNCPKCPILLPSNNPQVVDS
cHLP-B            LETECHVLDPTPVENCTVRPPHYHAVEGDCDVKILHDEGVDK-VIGAKCHSDPDSVEDVRRNCPKCPILLPLSDPHVVDS
BaltMPI           LETECHVLDPTP-------------------VKIMFNVDTFKEDVFA--------------------------------

CrotaIni     161  VEYVLNKHNEKLSGHVYEVLEISR-----------------------------------------------------RSHAS  240
cHLP-A            VEYVLNKHNEKLSGHVYEVLEISRGQHKYEPEAFYVEFAIVEVNCTAQEARDGHHQCHPYTAGEDHIAFCRATVFRSHAS
HSF               VEYVLNKHNEKLSGHIYEVLEISRGQHKYEPEAYYLEFVIVEINCTAQEAHDDHHQCHPYTAGEDHIAFCRSTVFRSHAS
BJ46a             VEYVLNKHNEKLSDHVYEVLEISRGQHKYEPEAYYVEFAIVEVNCTAQELHDDHHHCHPNTAGEDHIGFCRATVFRSHAS
cHLP-B            VEYVLNKHNEKLSGHVYEVLEISRGQHKYEPEAFYVEFAIVEVNCTAQEAHDDHHHCHPNTAGENHIGFCRATVFRSHAS
BaltMPI           ----------KLSDHVYEVLEISR-------------------------------------------------SHAS

CrotaIni     241  LEKPK-------------------------------------------------------------------------  318
cHLP-A            LEKPKDENFESDCVILDVKEGHAHSHLIQQHIEKYSTSPGHNST-------------------DEYVVECPVAFVEKEVP
HSF               LEKPKDEKFESNCVILDVKDGHAHSHLIQQHIEKNSISPEHNITILNFVHPDDHTSTSHES--HEHVAEVPVVFVKKELP
BJ46a             LEKPKDEQFESDCVILHVKEGHAHSHLIQQHVEKDSISPEHNNTALNFVHPHNDTSTSHES--HEHLAEVPVAFVKKELP
cHLP-B            LEKPKDEQFESDCVIFDVKEGHAHSHLIEHHIGNYNTSPGHNNTVLNLAHSHNHTSASHESHSHEHVAEVPVAVAKREVP
BaltMPI           LEKPKDEQFESDCVILHVKE-----------------------------------------------------------

CrotaIni     319  ------------------------  342
cHLP-A            TDMSDHDTPPVKGCPGRVLHFQL-
HSF               TDISDHHTTPVKGCPGKVHHFKLY
BJ46a             KDISDRHTTPVKGCPGKVHHFEL-
cHLP-B            TNTPHDHTHPVKLCPGKVHHFKL-
BaltMPI           ------------------------
```

Figura 9. Alinhamento das sequências de fragmentos trípticos do crotaini com as sequências de proteínas relacionadas. O alinhamento dos fragmentos trípticos do crotaini com proteínas análogas de soros de outras serpentes foi conseguido com o programa BLAST. Aminoácidos idênticos conservados em todas as sequências comparadas estão anotados em vermelho, correspondendo a 60% do total. A numeração das sequências apresentadas corresponde à do HSF. Traços horizontais indicam sequências não disponíveis para comparação ou *gaps* introduzidos numa sequência para maximizar o alinhamento entre as sequências. Os inibidores cujas sequências foram comparadas com a do crotaini são fatores hemorrágicos de soros de *Gloydius brevicaudus* (cHLP-A; ID: Q5KQS3), de *Protobothrops flavoviridis* (HSF; ID: P29695), de *B. jararaca* (Bj46a; ID: Q9DGI0), de *Gloydius brevicaudus* (cHLP-B; ID: Q5KQS2), e de *B. alternatus*, o BaltMPI (Palacio et al. 2017).

Ao realizar o alinhamento dos peptídeos trípticos sequenciados para o inibidor crotaini, unicamente com sequências dos inibidores isolados a partir do soro das serpentes *B. jararaca* e *B. alternatus*, que fazem parte, junto com a *C. d. terrificus*, da mesma subfamília, a *Crotalinae*, evidencia-se um grau maior de identidade nos peptídeos sequenciados (Figura 10.).

```
CrotaIni     1    ------------------------------KGTKDWADIGVRY-------------------------------------  80
BJ46a             MNSLVALVLLGQIIGSTLSSQVRGDLECDEKDAKEWTDTGVRYINEHKLHGYKYALNVIKNIVVVPWDGDWVAVFLKLNL
BaltMPI           -------------------SQVRGDLECDEKDAKEWTDIGVRYINEHKLHGYKYALNVIKNIVDVPWDGDWVAVFLKLNL

CrotaIni     81   --------------------------------RIIHDIATFEDEVFVKCHSTPDSVENVRR---KCPILLPPNDPHVVDS  160
BJ46a             LETECHVLDPTPVKNCTVRPQHNHAVEMDCDVKIMFNVDTFKEDVFAKCHSTPDSVENVRRNCPKCPILLPSNNPQVVDS
BaltMPI           LETECHVLDPTP-------------------VKIMFNVDTFKEDVFA---------------------------------

CrotaIni     161  VEYVLNKHNEKLSGHVYEVLEISR--------------------------------------------------RSHAS  240
BJ46a             VEYVLNKHNEKLSDHVYEVLEISRGQHKYEPEAYYVEFAIVEVNCTAQELHDDHHHCHPNTAGEDHIGFCRATVFRSHAS
BaltMPI           ----------KLSDHVYEVLEISR-------------------------------------------------SHAS

CrotaIni     241  LEKPK-------------------------------------------------------------------------  320
BJ46a             LEKPKDEQFESDCVILHVKEGHAHSHLIQQHVEKDSISPEHNNTALNFVHPHNDTSTSHESHEHLAEVPVAFVKKELPKD
BaltMPI           LEKPKDEQFESDCVILHVKE----------------------------------------------------------

CrotaIni     321  ---------------------  341
BJ46a             ISDRHTTPVKGCPGKVHHFEL
BaltMPI           ---------------------
```

Figura 10. Alinhamento das sequências de fragmentos trípticos do crotaini com as sequências dos fatores BJ46a e BaltMPI. O alinhamento mostrado é das sequências de fragmentos trípticos do crotaini com sequências disponíveis de proteínas análogas de soros de serpentes com distribuição geográfica próxima à da *C. d. terrificus*. O alinhamento foi conseguido com o programa BLAST, e aminoácidos idênticos conservados em todas as sequências comparadas estão anotados em vermelho, correspondendo a 73% do total. A numeração das sequências apresentadas corresponde à do Bj46a. Traços horizontais indicam sequências não disponíveis para comparação. Os inibidores cujas sequências foram comparadas com a do crotaini são fatores hemorrágicos de soros de *B. jararaca* (Bj46a; ID: Q9DGI0) e de *B. alternatus*, o BaltMPI (Palacio et al. 2017).

```
                                                                                KITVKPDVDYTLNS
                                                RMYELANIVNEIFRY                 KITVKPDVDYTLNSFAEWRK
                                                RMYELANIVNEILRY   HAALVGLEIWSNGDKI
                1                                          RYLYMHAALVGLEIWSNGDKI                 86
Bothropasina    EQQKYNPFRYVELFIVVDQGMVTKNNGDLDKIKARMYELANIVNEILRYLYMHAALVGLEIWSNGDKITVKPDVDYTLNSFAEWRK
Jararhagina     EQQRYDPYKYIEFFVVVDQGTVTKNNGDLDKIKARMYELANIVNEIFRYLYMHVALVGLEIWSNGDKITVKPDVDYTLNSFAEWRK


                                                   RSVGIVQDYSPINLVVAVIMAHE
                                                   RSVAIVEDYSPINLVVAVIMAHE
               87      KHDNAQLLTAIDFNGPTIGYA       RSVAIVEDYSPINLVVAVIMAHEMGHN                     172
Bothropasina    TDLLTRKKHDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSMCHPKRSVAIVEDYSPINLVVAVIMAHEMGHNLGIHHDTDFCSCGDYPCIMGPT
Jararhagina     TDLLTRKKHDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSMCHPKRSVGIVQDYSPINLVVAVIMAHEMGHNLGIHHDTGSCSCGDYPCIMGPT

               173                                                                                  258
Bothropasina    ISNEPSKFFSNCSYIQCWDFIMKENPQCILNEPLGTDIVSPPVCGNELLEVGEECDCGTPENCQNECCDAATCKLKSGSQCGHGDC
Jararhagina     ISNEPSKFFSNCSYIQCWDFIMNHNPECIINEPLGTDIISPPVCGNELLEVGEECDCGTPENCQNECCDAATCKLKSGSQCGHGDC

               259                                                                                  344
Bothropasina    CEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFHKNGQPCLDNYGYCYNGNCPIMYHQCYALFGADVYEAEDSCFKDNQKG
Jararhagina     CEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFHKNGQPCLDNYGYCYNGNCPIMYHQCYALFGADVYEAEDSCFKDNQKG

                                                     KMFYSNDDEHKGMVLPGTKC
               345                                   KMFYSNDDEHKG                          421
Bothropasina    NYYGYCRKENGKKIPCAPEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNDDEHKGMVLPGTKCADGKVCSNGHCVDVATAY
Jararhagina     NYYGYCRKENGKKIPCAPEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNDDEHKGMVLPGTKCADGKVCSNGHCVDVATAY
```

Figura 11. Alinhamento dos fragmentos trípticos da metaloprotease purificada com as sequências da bothropasina e jararhagina. Alinhamento dos peptídeos trípticos obtidos e sequenciados da metaloprotease purificada, indicados em azul, com as sequências das duas principais metaloproteases presentes no veneno de *B. jararaca*, bothropasina (ID: O93523) e jararhagina (ID: P30431). Os resíduos indicados em vermelho correspondem às posições variáveis entre bothropasina e jararhagina. A numeração dos aminoácidos corresponde à da sequência da bothropasina madura.

A figura 11 mostra o alinhamento dos 12 peptídeos trípticos da metaloprotease purificada no presente trabalho, apresentados na tabela 4, com as sequências depositadas nos bancos de dados para a jararhagina (ID: P30431) e a bothropasina (ID: O93523), duas metaloproteases homólogas e as mais abundantes do veneno de *B. jararaca*. Alguns dos peptídeos obtidos alinharam com regiões que continham resíduos peculiares da bothropasina e da jararhagina, refletindo a composição enzimática da preparação usada nos ensaios de inibição realizados neste trabalho.

O alinhamento dos peptídeos trípticos dos inibidores que foram obtidos cromatograficamente do soro de gambá segundo Neves-Ferreira et al., 2000, putativamente DM40 e DM43, foi feito em relação à sequência depositada em banco de

dados para o DM43 (ID:P82957), como apresentado na figura 12. A sequência do DM40 não se encontra disponível. Dos peptídeos trípticos obtidos do inibidor DM40 purificado neste trabalho, três alinharam perfeitamente a duas regiões da sequência para o inibidor DM43, e estão indicados sublinhados na figura.

```
DM43 putativo    1   ----------------------------------------KDGELLSTLPVVGLVGKF---------------RILTSE   80
DM43 (P82957)        LKAMDPTPPLWIKTESPSTPWTNVTLLCVATNTEELSFQVWKDGELLSTLPVVGLVGKFWLGPVTADNRGIYRCRILTSE

DM43 putativo   81   NDWTPLSAPVEVTGKEPLPAPSLHAEPGPWILPGLETKL--RGMLLGMIFDLYQEGEQEPVKS-----------------   160
DM43 (P82957)        NDWTPLSAPVEVTGKEPLPAPSLHAEPGPWILPGLETKLHCRGMLLGMIFDLYQEGEQEPVKSSQTPSAEATFIVNSTGN

DM43 putativo  161   -------------------------------KANFYILNDRDFRPGDIVTFS--------------KLFKDGQETPVEVV   240
DM43 (P82957)        YSCLYRAPASAPSVNSTPSETIHVVIPDFLPKANFYILNDRDFRPGDIVTFSCWARFSEREYDLEFKLFKDGQETPVEVV

DM43 putativo  241   PISDPMKV---------------------RNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQ  291
DM43 (P82957)        PISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKYSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQ
```

Figura 12. Alinhamento das sequências de fragmentos trípticos dos inibidores DM40 e DM43 putativos com a sequência descrita para o DM43. Alinhamento dos peptídeos trípticos obtidos e sequenciados para os inibidores DM40 e DM43 putativos com a sequência depositada em bancos de dados para o inibidor DM43 (ID: P82957). As sequências sublinhadas indicam fragmentos oriundos da preparação do DM40. A cor vermelha indica resíduos idênticos nas sequências alinhadas, cuja numeração corresponde à depositada para o DM43.

5.6 Análise da interação entre o crotaini e a bothropasina

A interação entre o inibidor crotaini e a bothropasina foi monitorada em tempo real por SPR, em instrumento Biacore T200. Após imobilização do crotaini no chip CM5, avaliou-se inicialmente a produção de sinal decorrente da ligação entre o inibidor e a bothropasina ao se injetar solução de metaloprotease sobre a superfície do chip, registrando-se o sensorgrama que se mostra na figura 13.

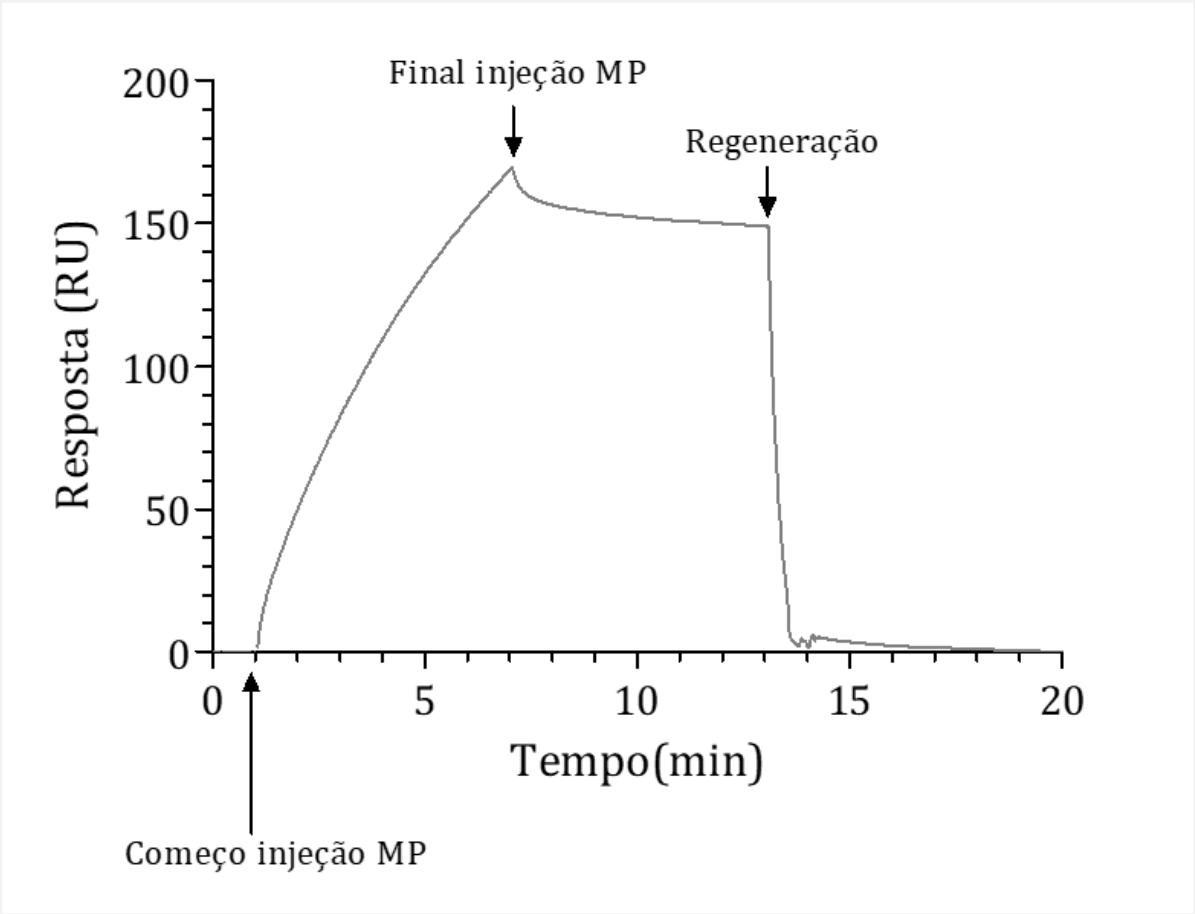

Figura 13. Ensaio de ligação entre bothropasina e crotaini por SPR. Sensorgrama obtido após injeção de bothropasina 6 μM sobre o inibidor de metaloproteases crotaini previamente imobilizado sobre a superfície do chip CM5. A bothropasina, dissolvida em HBS-N, foi injetada com fluxo de 30 uL/min, com tempo de contato de 360 segundos, após o qual começou o período de dissociação por passagem de HBS-N apenas. A regeneração realizou-se com glicina HCl pH 3,0. MP corresponde à solução de bothropasina 6 μM e RU à unidades relativas.

Após verificar o sucesso da ligação da metaloprotease ao inibidor imobilizado sob condições nativas, avaliou-se o efeito da o-fenantrolina, um quelante de Zn^{+2}, na interação crotaini-bothropasina. Para isto, uma amostra de metaloprotease foi incubada com o-fenantrolina e, então, equilibrada com HBS-N livre de quelante por filtração em gel de Sephadex G25 antes do ensaio por SPR; como controles deste ensaio, foram preparadas amostras de bothropasina nativa ou apenas filtradas em coluna de Sephadex G25. Os

sensorgramas obtidos com estas preparações de metaloprotease estão apresentados na figura 14.

As amostras de bothropasina usadas nos experimentos de SPR com chip CM5 derivatizado com crotaini, que haviam sido tratadas ou não com o-fenantrolina, foram paralelamente ensaiadas quanto a suas atividades proteolíticas sobre o peptídeo de fluorescência apagada Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr; a figura 15 mostra o registro da fluorescência decorrente da hidrólise do substrato fluorogênico durante os ensaios com a metaloprotease submetida aos diferentes tratamentos.

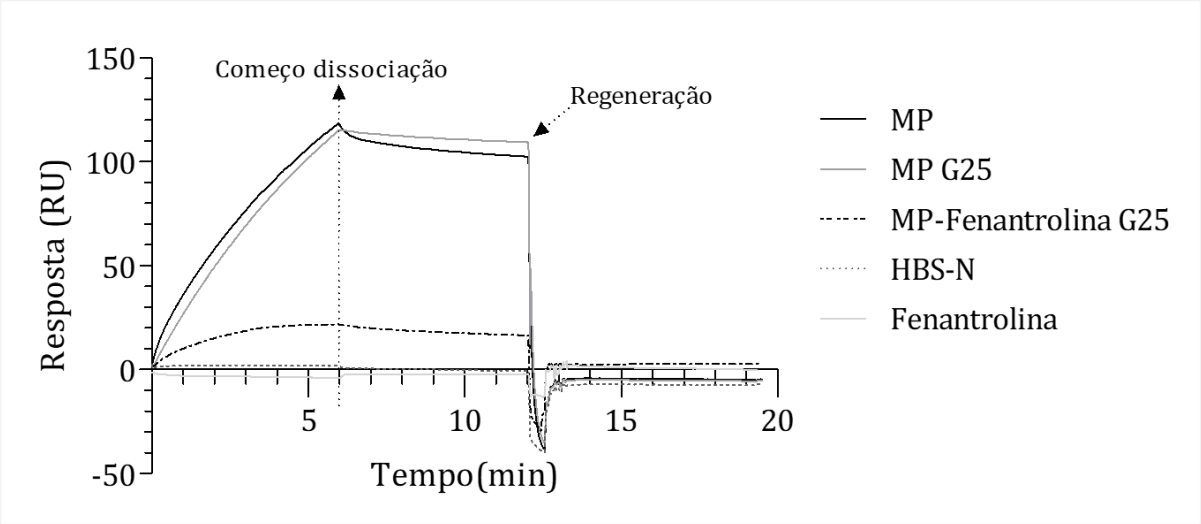

Figura 14. Efeito de quelante de Zn^{+2} na interação entre bothropasina e crotaini avaliada por SPR. Sensorgramas obtidos com chip CM5 derivatizado com crotaini após injeção de diferentes soluções, com fluxo de 30 uL/min: MP, bothropasina nativa 6 µM; MP G25, bothropasina 6 µM, apenas filtrada em Sephadex G-25; MP-fenantrolina G25, bothropasina 6 µM tratada com quelante de Zn^{+2} 10 mM por 10 min a 37°C e filtrada em G25; HBS-N, apenas salina tamponada; Fenantrolina, apenas solução quelante 10 mM em HBS-N. A duração de cada injeção, ou tempo de contato, foi de 360 segundos, após o qual foi iniciado o período de dissociação com HBS-N. A regeneração foi realizada com glicina HCl pH 3,0, por 30 segundos. RU significa unidades relativas, resposta do Biacore T200.

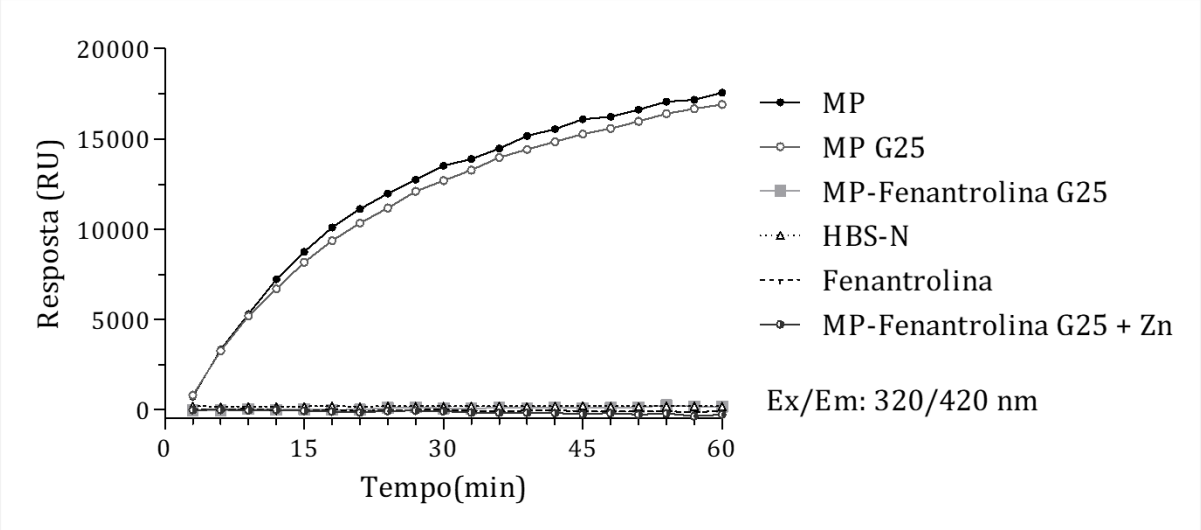

Figura 15. Atividade proteolítica da bothropasina purificada, antes e após tratamento com o-fenantrolina. As atividades da bothropasina submetida aos tratamentos ou não com o-fenantrolina, descritos na figura anterior, foram avaliadas pelo registro de fluorescência produzida pelas reações de 50 uL de enzima com 100 uL de substrato Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr 8,4 µM, realizadas em placa de 96 poços. As medidas foram obtidas em leitor de fluorescência ajustado para excitação em 320 nm e emissão 420 nm. As preparações da bothropasina foram: MP, bothropasina nativa 6 µM; MP G25, bothropasina 6 µM, apenas filtrada em Sephadex G25; MP-fenantrolina G25, bothropasina 6 µM tratada com quelante de Zn^{+2} 10 mM por 10 min a 37ºC e filtrada em G-25; HBS-N, apenas salina tamponada; Fenantrolina, apenas solução quelante 10 mM em HBS-N; MP-fenantrolina G25 + Zn^{+2}, enzima reconstituída por adição de ZnCl 10 µM. RU significa unidades relativas de fluorescência.

5.7 Determinação das constantes cinéticas da interação entre crotaini e bothropasina

Parte da caracterização da interação entre o crotaini e a bothropasina foi descrita através da determinação de constantes cinéticas de duas naturezas. A primeira, referente à interferência do inibidor sobre a velocidade de reação catalisada pela bothropasina, permitiu o estabelecimento da constante de inibição, K_i, calculada a partir dos parâmetros

cinéticos K_M e IC_{50}. A outra, determinada por medidas de SPR, revelou detalhes da interação entre as duas macromoléculas através do cálculo das constantes de associação, ka, de dissociação, kd, e de dissociação no equilíbrio, k_D.

O cálculo de K_i do crotaini para a bothropasina implicou na determinação, preliminarmente, das constantes K_M e IC_{50} da reação de hidrólise do substrato Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr catalisada pela enzima. Análise por regressão não linear dos dados apresentados na figura 16B, usando-se a equação Enz_Ki.GFE do programa GraFit (Leatherbarrow, R.J., 2009), indicou K_M de 81,1 μM. Por outro lado, o IC_{50} do crotaini para a reação catalisada pela bothropasina foi estabelecida em 64,4 nM, como indicado no gráfico de velocidades iniciais da reação vs. log [crotaini], mostrado na figura 16D. De posse dos parâmetros K_M e IC_{50}, foi calculada a constante de inibição K_i por meio da equação de Cheng – Prusoff: $K_i = \frac{IC_{50}}{1+(\frac{[S]}{K_M})}$ (Auld et al. 2004). O valor determinado para o K_i foi de 58 nM, que se mostra na tabela 5.

Os resultados obtidos para determinação do IC_{50} também foram expressos de outra maneira, como mostrado na figura 16E, onde as velocidades iniciais das reações foram expressas em função das relações [crotaini]/[bothropasina]. O gráfico obtido mostra que a velocidade da reação tende a zero quando a relação molar inibidor/enzima se aproxima de 1.

O conjunto de constantes cinéticas ka, kd e K_D, derivado de resultados de experimentos por SPR, foi obtido utilizando-se a abordagem *single cycle kinetics* disponível no instrumento Biacore. Neste procedimento, a solução de bothropasina foi injetada em concentrações crescentes e sucessivamente, de 249 nM a 1261 nM, sobre o crotaini imobilizado no chip CM5; a regeneração do chip foi feita após o período de dissociação, introduzido depois da última injeção de bothropasina. O sensorgrama obtido

está apresentado na figura 16F, que permitiu a determinação das constantes de associação (ka), de dissociação (kd) e a de dissociação no equilíbrio (K_D) para a interação bothropasina-crotaini, aplicando-se o modelo de ligação 1 para 1 disponível no programa do Biacore. Na tabela 5 estão mostrados os valores obtidos para as constantes.

Tabela 5. Constantes cinéticas determinadas para a interação bothropasina com o inibidor crotaini

ka (1/Ms)*	kd (1/s)x10^{-04}*	K_D (M)x10^{-06}*	K_i (µM) †
1585	0.3	0.02	0.058

*As constantes foram determinadas utilizando cinco concentrações de bothropasina, e as medidas foram realizadas a 25°C em tampão HBS-N (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).
†Constante calculada pela equação de Cheng-Prusoff.

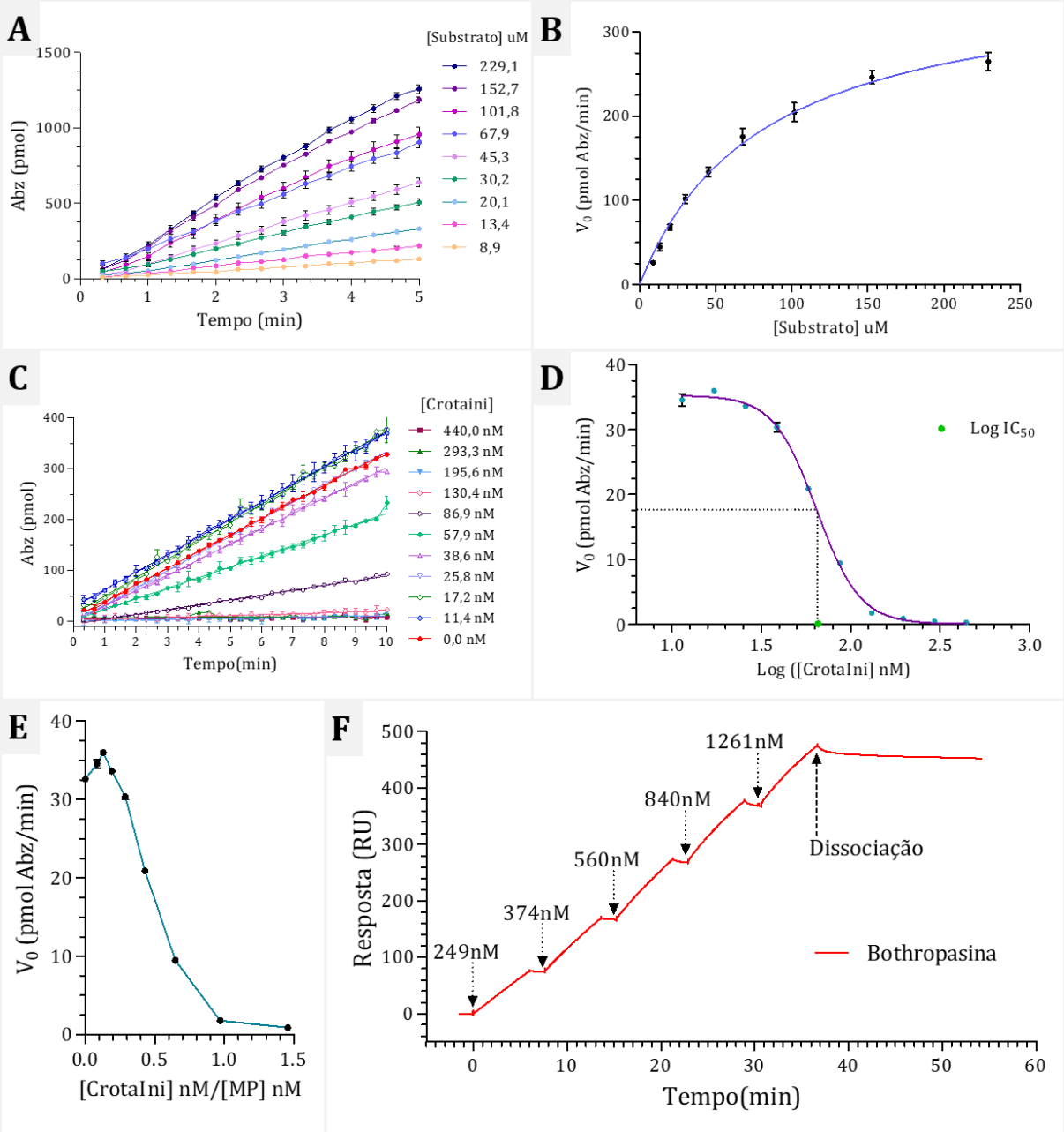

Figura 16. Determinação de constantes cinéticas para a interação crotaini - bothropasina. A) Velocidades iniciais, V_0, das reações de hidrólise do substrato Abz-GPQGLAGQ-NO2Tyr, em nove concentrações entre 8,9 µM e 229 µM, medidas a 25°C em tampão Tris HCl 50 mM – CaCl2 5 mM, pH 8,1, catalisadas por bothropasina 134 nM. **B)** Gráfico de V_0 vs. [substrato], usado como base para cálculo de V_{max} e K_M da reação catalisada pela bothropasina. **C)** Velocidades iniciais (V_0) de hidrólise do substrato (18 µM), por bothropasina 134 nM na presença de diferentes concentrações do crotaini entre 11,4 nM e 440 nM. **D)** Gráfico de V_0 vs. log [crotaini] para determinação do IC_{50} para o crotaini. **E)** Gráfico de V_0 vs. relação [crotaini]/[bothropasina] nas reações sob inibição, para ilustrar a estequiometria da interação enzima/inibidor. **F)** Sensorgrama obtido por SPR no Biacore usando chip CM5 derivatizado com crotaini e cinco concentrações de bothropasina, indicadas; etapa de dissociação realizada com HBS-N, pH 7,4. Medidas realizadas a 25°C em tampão HBS-N, que permitiram determinação das constantes ka, kd e K_D, através da metodologia *single cycle kinetics* disponível no Biacore.

5.8 Análise da interação entre a bothropasina e os inibidores DM40 e DM43

De maneira análoga ao que foi descrito para o estudo da interação entre o inibidor crotaini e a bothropasina, as interações entre esta metaloprotease e os inibidores DM40 e DM43, extraídos do soro de *D. marsupialis*, também foram caracterizadas através da determinação das respectivas constantes cinéticas K_i, ka, kd, e k_D. Enquanto K_i expressa a afinidade do inibidor pela enzima, tendo sido determinada pela interferência do inibidor na velocidade de hidrólise do substrato, as constantes ka, kd e k_D foram determinadas por experimentos de SPR e refletem os processos de associação, dissociação e dissociação no equilíbrio, respectivamente, das interações entre as macromoléculas. Também foram avaliados os efeitos de um agente quelante sobre as interações da bothropasina, uma metaloprotease, com seus substrato e inibidores proteicos.

A figura 17A mostra os sensorgramas obtidos para as interações entre a bothropasina e os inibidores DM40 e DM43, na ausência e presença de EDTA; o chip usado nestes experimentos de SPR, no Biacore T200, foi preparado com os inibidores DM40 e DM43 previamente biotinilados e ligados ao chip CM5, ligando também como controle ovoalbumina biotinilada, por ponte de avidina. Paralelamente, a figura 17B apresenta o efeito do EDTA na atividade proteolítica da bothropasina sobre o peptídeo fluorogênico Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr.

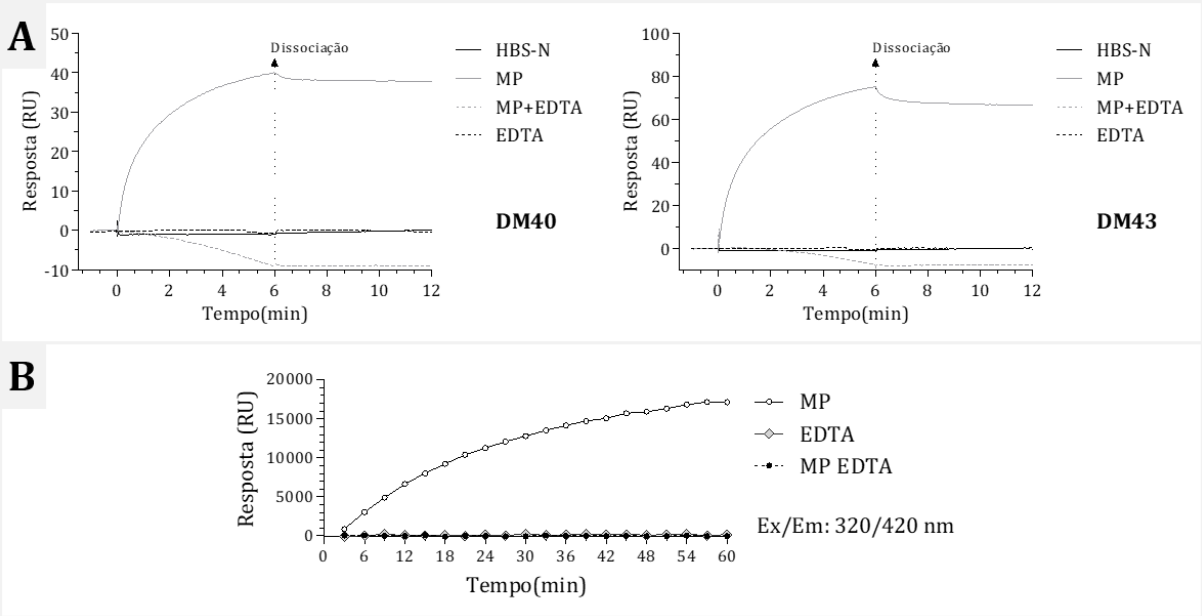

Figura 17. Efeito do EDTA sobre a bothropasina em suas interações com substrato e inibidores proteicos. A) Sensorgramas obtidos por injeção de solução de bothropasina em estado nativo (MP) e após incubação desta com EDTA (MP+EDTA) no chip com os inibidores DM40 e DM43 imobilizados. Os sensorgramas marcados HBS-N e EDTA foram obtidos com soluções de HBS-N apenas ou contendo quelante 1 mM, respectivamente. **B)** Atividades da bothropasina antes (MP) ou após tratamento com EDTA 1 mM (MP EDTA), avaliadas pelo registro de fluorescência produzida pelas reações de 50 µL de enzima 6 µM com 100 µL de substrato Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr 8,4 µM, realizadas em placa de 96 poços. A curva marcada EDTA foi obtida pela passagem de solução quelante 1 mM. As medidas foram obtidas em leitor de fluorescência ajustado para excitação em 320 nm e emissão 420 nm. RU significa unidades relativas de fluorescência.

5.8.1 Determinação das constantes cinéticas da interação entre a bothropasina e os inibidores DM40 e DM43

O cálculo dos K_i dos inibidores DM40 e DM43 para as reações catalisadas pela bothropasina foi realizado como descrito anteriormente para o crotaini, item 5.7. Inicialmente, foram determinadas as velocidades iniciais das reações catalisadas por 207 nM de bothropasina para hidrólise do substrato Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr 8,4 µM, na presença das concentrações indicadas dos inibidores DM40 e DM43 (figura 18A). As

curvas obtidas nos gráficos das velocidades iniciais em função dos logaritmos das respectivas concentrações de cada inibidor permitiram os cálculos dos IC_{50}, as concentrações de cada inibidor necessárias para reduzir em 50% a atividade da enzima. Como indicado na figura 18B, os valores IC_{50} determinados para o DM40 e o DM43 foram 155,2 e 153,5 nM, respectivamente. Também foi possível revelar graficamente a estequiometria da interação enzima/inibidor, como indicado na figura 18C, onde as velocidades iniciais das reações conduzidas na presença de diferentes concentrações de DM40 ou DM43 foram apresentadas em função das respectivas razões [inibidor]/[enzima]. Nota-se que as velocidades residuais tendem para zero quando as razões molares se aproximam de 1.

A partir dos valores de IC_{50} determinados para os DM40 e DM43 na reação de hidrólise do substrato Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr, foi possível calcular os respectivos K_i para as interações entre bothropasina e DM40 e DM43. Estes valores estão apresentados na tabela 6, para comparações.

A determinação das constantes cinéticas ka, kd e K_D para os inibidores DM40 e DM43 foram realizadas por SPR, utilizando-se o método de *single cycle kinetics* do Biacore. A bothropasina foi injetada sucessivamente, em duplicata, nas concentrações 211, 316, 474, 711 e 1067 nM no chip CM5 onde estavam imobilizados os inibidores; as etapas de regeneração do chip foram feitas após os períodos de dissociação com HBS-N apenas, introduzidos depois das últimas injeções de bothropasina. Os sensorgramas obtidos estão apresentados na figura 18D, e permitiram a determinação das constantes de associação (ka), de dissociação (kd) e a de dissociação no equilíbrio (K_D) para as interações da bothropasina com os DM40 e DM43, aplicando-se o modelo de ligação 1 para 1 disponível

no programa do Biacore. Na tabela 6 estão mostrados os valores obtidos para as constantes.

Tabela 6. Constantes cinéticas determinadas para a interação entre a bothropasina e os inibidores DM40 e DM43

Inibidor	ka (1/Ms)*	kd (1/s)x10^{-04}*	K_D (M)x10^{-06}*	K_i (µM) †
DM40	1878	0.7	0.04	0.141
DM43	3361	0.6	0.02	0.139

*As constantes foram determinadas utilizando cinco concentrações de bothropasina, e as medidas foram realizadas a 25°C em tampão HBS-N (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).

†Constante calculada pela equação de Cheng-Prusoff.

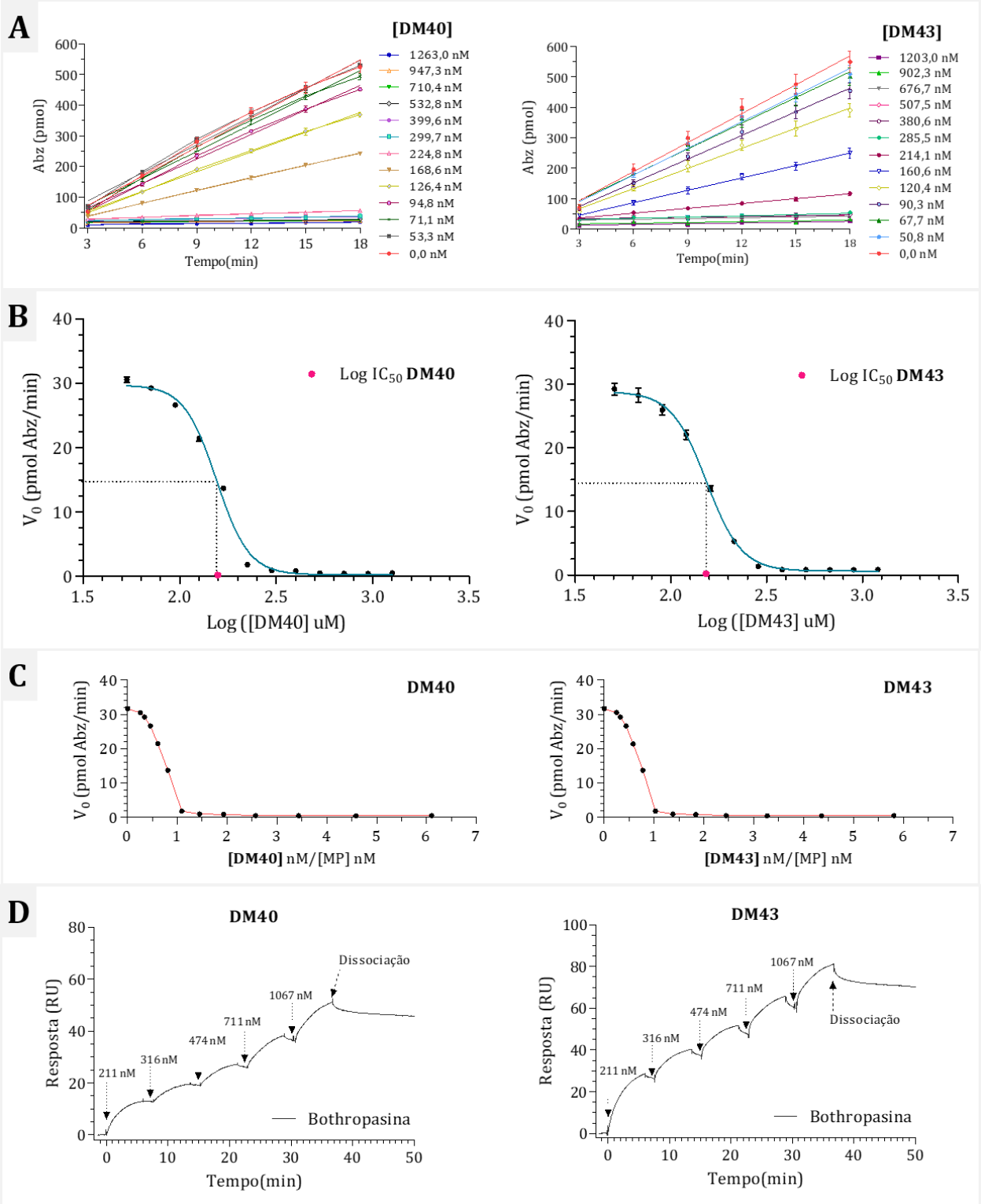

Figura 18. Determinação de constantes cinéticas para a interação entre bothropasina e os inibidores DM40 e DM43. A) Velocidades iniciais (V_0) de hidrólise do substrato (18 µM), por bothropasina 134 nM na presença de diferentes concentrações dos inibidores DM40 e DM43, entre ~ 50 nM e 1300 nM. **B)** Gráficos de V_0 vs. log [DM40] ou log [DM43], para determinação dos IC_{50} para os respectivos inibidores. **C)** Gráficos de V_0 vs. relação [DM40]/[bothropasina] ou V_0 vs. relação [DM43]/[bothropasina] das

respectivas reações sob inibição, para ilustrar a estequiometria das interações enzima/inibidor. **D)** Sensorgramas obtidos por SPR no Biacore, usando chip CM5 derivatizado com DM40 e DM43 e cinco concentrações de bothropasina, indicadas no gráfico; etapa de dissociação realizada com HBS-N, pH 7,4. Medidas realizadas a 25°C em tampão HBS-N, que permitiram determinação das constantes ka, kd e K_D, através da metodologia *single cycle kinetics* disponível no Biacore.

5.9 Cromatografia de afinidade de veneno de *B. jararaca* em resinas de Sepharose-DM40 e Sepharose-DM43

As resinas de Sepharose derivatizadas com os inibidores DM40 e DM43 foram preparadas como descrito no item 4.11, com as quais foram montadas colunas de 0,6 x 3,5 cm. As condições usadas e os resultados obtidos quando amostras de veneno de *B. jararaca* foram cromatografadas nestas colunas estão mostrados na figura 19, que representam as distribuições de proteína e de atividade proteolítica sobre o substrato fluorogênico Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr. Os perfis eletroforéticos de frações cromatográficas representativas estão mostrados na figura 20.

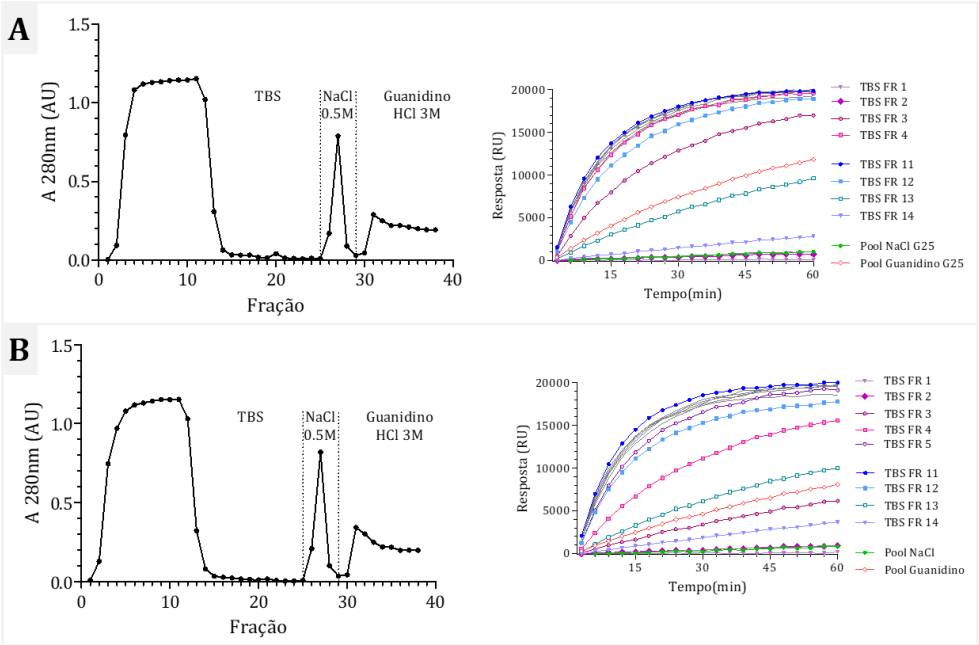

Figura 19. Cromatografias de afinidade de veneno de *B. jararaca* em colunas de Sepharose-DM40 e Sepharose-DM43. Amostras de 5 mL de veneno de *B. jararaca* a 1mg/mL em TBS foram aplicadas, separadamente e em alíquotas de 500 µL a cada 3 minutos, em colunas Sepharose-DM40 (A) e Sepharose-DM43 (B). Após lavagem da coluna com TBS, para remoção de proteínas que não se ligaram à resina, foram passados, sucessivamente, 5 mL de soluções de NaCl 0,5 M e de guanidino HCl 3 M. Durante todo o processo foram coletadas frações de 500 µL e suas absorbâncias registradas a 280 nm. As atividades proteolíticas sobre o substrato Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr de algumas frações representativas foram avaliadas pelos registros contínuos de fluorescência liberada em cada reação, indicados à direita da figura.

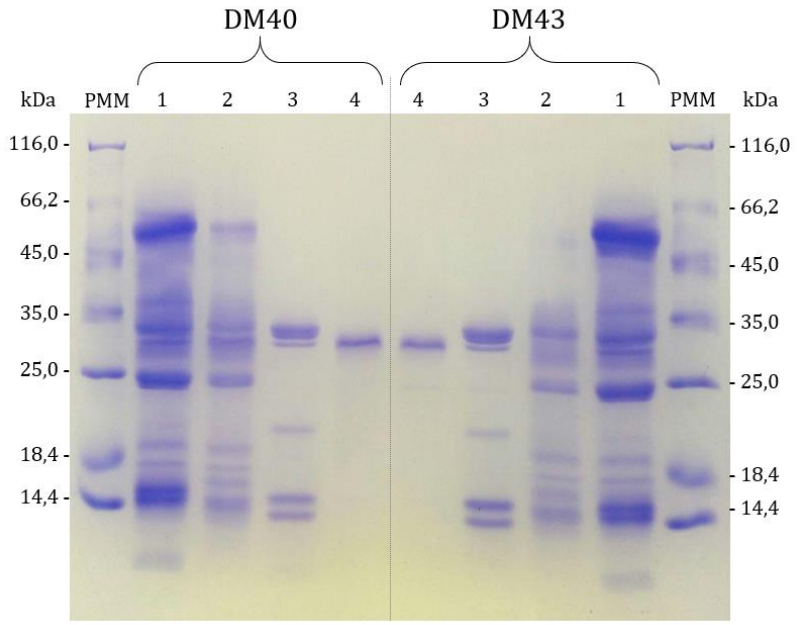

Figura 20. Perfis eletroforéticos de frações representativas das cromatografias de afinidade. Alíquotas de solução de veneno de *B. jararaca* (linha 1) e das frações 3 (linha 2), 27 (linha 3) e 31 (linha 4), das cromatografias em Sepharose-DM40 e Sepharose-DM43, mostradas na Figura 19, foram analisadas por SDS-PAGE 12%, sob condições redutoras. As frações foram escolhidas como representativas das proteínas que não se ligaram aos inibidores das resinas, e das eluídas pela passagem de NaCl 0,5M e guanidino HCl 3M pelas colunas. PMM: padrão de massas moleculares.

5.10 Análise da interação entre o crotaini e proteínas do veneno de *C. d. terrificus*

Considerando-se a origem do inibidor crotaini, do soro de *C. d. terrificus*, foi realizado experimento para testar a hipótese de que este inibidor pudesse interagir com proteínas provenientes do próprio veneno crotálico. Para isto, o veneno foi fracionado para obtenção das proteínas de massa molecular superior a ~20 kDa, para uso em experimentos de interação com o crotaini, por SPR.

5.10.1 Fracionamento do veneno de *C. d. terrificus*

O veneno de *C. d. terrificus* foi fracionado por filtração em gel em coluna de Sephadex G75 (figura 21), recuperando-se as proteínas de tamanho igual ou superior ao da BApNA-hidrolase, atividade ensaiada em alíquotas das frações como descrito no 4.6.2. Formaram-se dois *pools*, que foram utilizados para avaliar possível interação das proteínas constituintes com o inibidor crotaini, isolado do soro de cascavel.

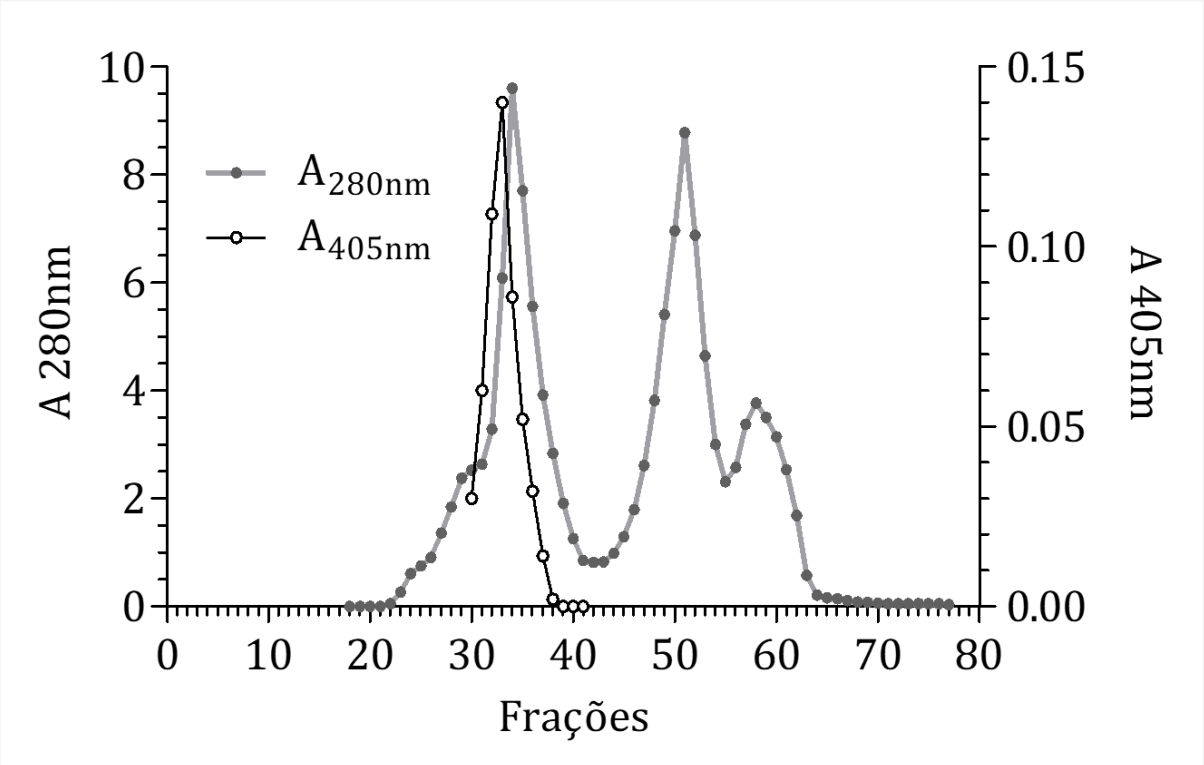

Figura 21. Fracionamento do veneno de *C. d. terrificus* por filtração em gel. Amostra de veneno de *C. d. terrificus*, contendo 520 mg em 3 mL de tampão HBS-N, foi clarificada por centrifugação a 14.000 x g por 5 min e aplicada à coluna de Sephadex G75 (1,5 x 102 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A cromatografia foi feita com fluxo de 0,3 mL/min, coletando-se frações de 3 mL. A eluição das proteínas foi avaliada por medidas de A_{280nm} das frações coletadas e as respectivas atividades amidolíticas medidas pela hidrólise do BApNA, pelas leituras de A_{405nm} do produto formado. Com base nestes resultados foram formados dois *pools*: P1 (FR 23-31) e P2 (FR 32-37).

5.10.2 Medidas de interação entre componentes do veneno de *C. d. terrificus* e crotaini

Para se revelar possíveis interações entre o inibidor isolado do soro de *C. d. terrificus* e componentes do veneno desta espécie, amostras das soluções dos *pools* P1 e P2, descritos na figura 21, foram injetados sobre o chip CM5 com o crotaini imobilizado na superfície, analisando-se em tempo real qualquer possível interação usando SPR, no Biacore T200 (Figura 22).

Além das análises sob condições nativas, os materiais presentes nos *pools* P1 e P2 foram tratados com EDTA antes análises por SPR. O uso de EDTA como quelante nestes experimentos deveu-se à precipitação de proteínas dos *pools* P1 e P2 na presença de o-fenatrolina. Na figura 22 apresentam-se os sensorgramas obtidos nos experimentos realizados.

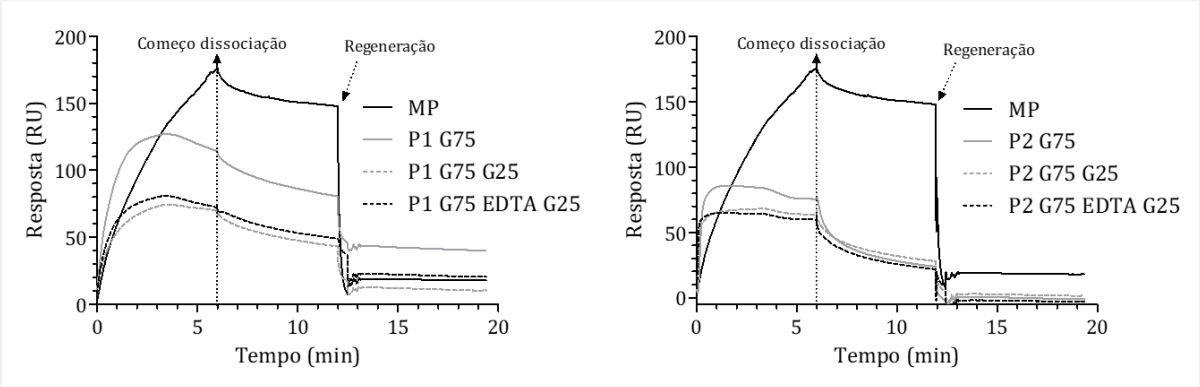

Figura 22. Análise por SPR de interações entre crotaini e componentes do veneno de *C. d. terrificus*. Alíquotas dos *pools* P1 e P2, obtidos pelo fracionamento do veneno de *C. d. terrificus* como descrito na Figura 21, foram inicialmente diluídas até concentração de 0,5 µg/µL, com HBS-N. Amostras destas soluções foram então individualmente ensaiadas por SPR, sem tratamento adicional, por injeção nos chips com crotaini imobilizado (P1 G75 e P2 G75). Além destes ensaios, foram realizados outros nos quais as amostras foram filtradas em coluna de Sephadex G-25 antes e após tratamento com EDTA 10 mM (P1 G75 G25 e P2 G75 G25) e (P1 G75 EDTA G25 e P2 G75 EDTA G25), respectivamente. Solução de bothropasina (MP), nas mesmas condições das proteínas de veneno crotálico, foi usada como controle positivo. Nos experimentos de SPR, as amostras foram injetadas com fluxo de 30 µL/min, com um tempo de contato de 360 segundos e tempo de dissociação com HBS-N de 360 segundos. A regeneração após cada injeção realizou-se com glicina HCl pH 3,0 por 30 segundos em fluxo de 30 µL/min, realizando-se as medidas a 25°C em HBS-N.

5.11 Análise da interação de serinoproteases do veneno de *B. jararaca* com o inibidor sintético SFTI-R

De forma análoga à análise feita entre a metaloprotease bothropasina e os inibidores de metaloprotease crotaini, DM40 e DM43, avaliamos também a interação entre serinoproteases do veneno de *B. jararaca* e o inibidor sintético de serinoproteases SFTI-R. Para isto, foram obtidos cinco *pools* de serinoproteases a partir do veneno através de dois passos cromatográficos, que foram então usados em experimentos de SPR em chip com o peptídeo SFTI-R imobilizado. Os dados obtidos permitiram descrever as interações entre as diferentes preparações de serinoprotease com o inibidor SFTI-R através dos

respectivos parâmetros cinéticos. A imobilização do SFTI-R ao chip CM5 do Biacore foi descrita no item 4.12.

5.11.1 Obtenção de diferentes serinoproteases do veneno de *B. jararaca*

O passo inicial para obtenção das serinoproteases do veneno de *B. jararaca* foi cromatografia por afinidade em resina Sepharose-SFTI-R. A preparação da resina, pelo acoplamento do inibidor SFTI-R à matriz CM-Sepharose, foi descrita no item 4.10. Após passagem de solução de veneno pela coluna de afinidade Sepharose-SFTI-R equilibrada com Tris HCl 20 mM, NaCl 50 mM, pH 8,1, a resina foi percolada, sucessivamente, com este mesmo tampão e com pequeno volume de SSN para eliminar as proteínas não ligadas, ou fracamente ligadas, a ela. As proteínas ligadas mais fortemente à resina Sepharose-SFTI-R foram, então, recuperadas percolando-se NaCl 0,5M pela coluna. A eluição dos componentes do veneno foi acompanhada por medidas de A_{280mn} e de atividade amidásica sobre o substrato BApNA nas frações coletadas, como indicado na figura 23A. Os perfis eletroforéticos das proteínas eluídas ao longo deste processo cromatográfico foram determinados para algumas das frações coletadas, representativas das condições de eluição usadas, como mostrado na figura 23B. Baseado nos resultados de distribuição de atividade amidásica e perfil eletroforético das frações, o material recuperado com NaCl 0,5M foi reunido e concentrado sob pressão de N_2 em câmara de ultrafiltração da Amicon®. A figura 23C mostra o resultado da cromatografia deste material concentrado em coluna de Sephacryl S100 (0,9 x 79 cm), indicando a distribuição da atividade amidásica sobre o BApNA que, em conjunto com os perfis eletroforéticos mostrados na figura 23D, direcionou a formação de cinco *pools* de serinoproteases para os estudos de SPR no Biacore.

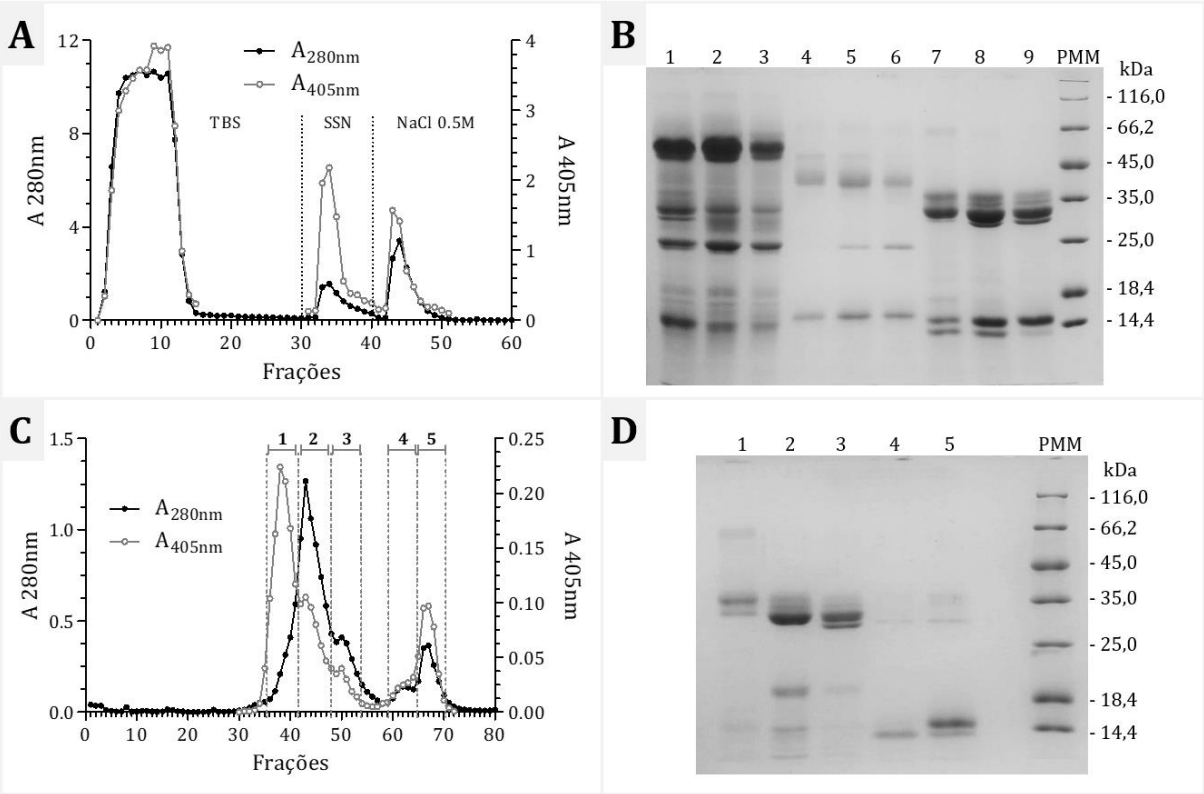

Figura 23. Obtenção de serinoproteases do veneno de *B. jararaca*. A) O veneno de *B. jararaca* (100 mg) foi dissolvido em 10 mL de TBS e aplicado lentamente na coluna de afinidade Sepharose-SFTI-R. Após lavagem da coluna por passagem de TBS seguida de SSN para retirada de proteínas fracamente ligadas, a resina foi percolada com NaCl 0,5 M. Foram coletadas frações de 1 mL, medindo-se as respectivas A_{280nm} e atividades proteolíticas sobre o BApNA, medidas por A_{405nm} do produto formado nas reações e indicadas no gráfico. **B)** Perfis eletroforéticos por SDS-PAGE 12 %, sob condições redutoras, de amostra de veneno de *B. jararaca* na linha 1, e de frações representativas das condições de eluição descritas em A, nas linhas 2-9: frações 7, 12, 33, 34, 35, 43, 44 e 45; PMM indica padrão de massas moleculares. **C)** Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S100 (0,9 x 79 cm) do material recuperado nas frações 43-45 da cromatografia de afinidade. Após concentração para 0,7 mL, o material foi aplicado à coluna equilibrada com TBS e corrida com fluxo de 0,05 mL/min, coletando-se frações de 0,5 mL. As A_{280nm} e atividades proteolíticas sobre o BApNA das frações foram avaliadas e indicadas no gráfico. Baseado no perfil de atividade das frações, elas foram reunidas em cinco *pools*, separados por barras verticais e numerados 1-5 no gráfico. **D)** Perfil eletroforético por SDS-PAGE 12 %, sob condições redutoras, dos cinco *pools* de serinoproteases formados: 1. *Pool* 1; 2. *Pool* 2; 3. *Pool* 3; 4. *Pool* 4; 5. *Pool* 5; PMM: padrão de massas moleculares.

5.11.2 Avaliação da interação entre o SFTI-R e diferentes serinoproteases

Cada um dos *pools* de serinoproteases obtidos por filtração em gel, figura 23C, foram diluídos com HBS-N até uma concentração aproximada de 200 nM e ensaiados por SPR no Biacore, em chip com o inibidor SFTI-R imobilizado. Os sensorgramas obtidos estão mostrados na figura 24.

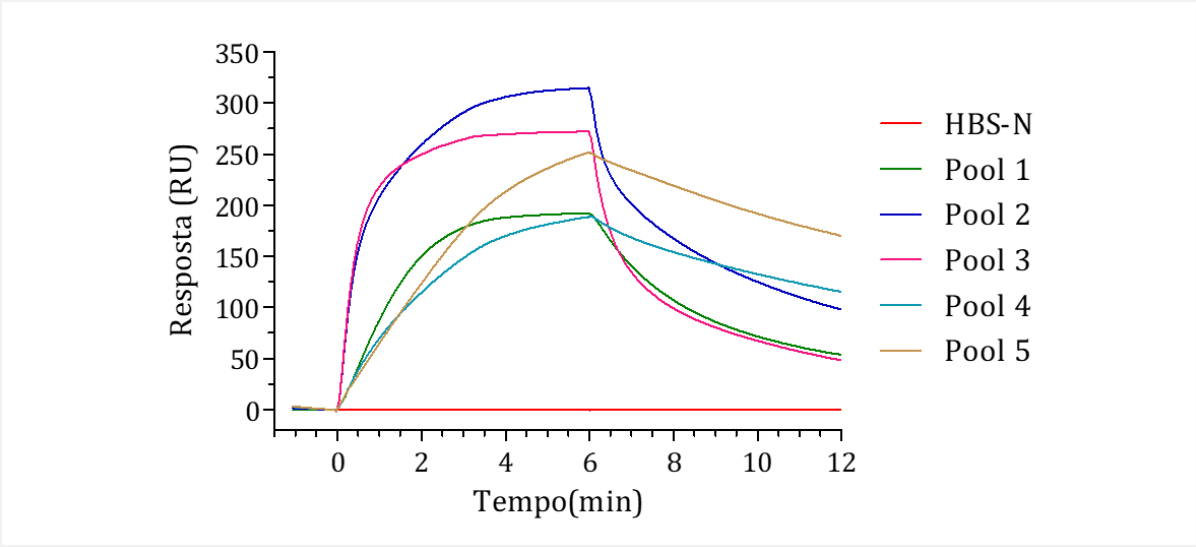

Figura 24. Avaliação das interações de diferentes serinoproteases com o peptídeo SFTI-R por SPR. Cada preparação de serinoprotease em concentração aproximada de 200 nM em tampão HBS-N, foi injetada sobre a superfície do chip CM5 derivatizado com o inibidor SFTI-R com fluxo de 30 µL/min, tempo de contato de 360 segundos e de dissociação com HBS-N de 360 segundos. A regeneração foi realizada com glicina HCl 10 mM pH 3,0. Todas as medidas foram feitas a 25°C.

5.11.3 Determinação das constantes cinéticas da interação entre o SFTI-R e serinoproteases do veneno de *B. jararaca*

As constantes cinéticas relacionadas às interações entre SFTI-R e serinoproteases de veneno de *B. jararaca* foram determinadas tanto por cinética enzimática, no caso do K_i, como por medidas de SPR, que estabeleceram as constantes de associação, ka, de dissociação, kd, e de dissociação no equilíbrio, k_D.

Os cálculos de K_i do inibidor SFTI-R para cada serinoprotease estudada implicou nas determinações preliminares dos K_M de cada enzima para a hidrólise do substrato BApNA e dos respectivos IC_{50} do inibidor para esta reação. Estes dados foram produzidos a partir dos resultados apresentados na figura 25, a seguir. Análise por regressão não linear, usando-se a equação Enz_Ki.GFE do programa GraFit (Leatherbarrow, R.J., 2009), dos dados de cada reação apresentados na figura 25B, indicou os seguintes valores de K_M para os *pools* de 1 a 5, respectivamente: 1172 μM; 775 μM; 808 μM; 736 μM e 780 μM.

Os resultados apresentados na figura 25C permitiram a determinação dos IC_{50} do inibidor SFTI-R para as reações de hidrólise do BApNA pelas serinoproteases dos *pools* 1 a 5, indicando os seguintes valores, respectivamente: 63 μM; 24 μM; 16 μM; 6 μM e 13 μM.

De posse dos parâmetros K_M e IC_{50}, referentes a cada serinoprotease, foram calculadas as respectivas constantes de inibição K_i por meio da equação de Cheng-Prusoff, da maneira previamente descrita no item 5.7; os valores individuais de K_i estão indicados na tabela 7.

Por outro lado, as determinações das constantes cinéticas ka, kd e K_D foram realizadas em experimentos de SPR, utilizando o método de *single cycle kinetics* do Biacore. Cada *pool* foi injetado em cinco concentrações diferentes, indicadas nas curvas respectivas, sobre a superfície do chip onde encontrava-se imobilizado o inibidor SFTI-R. A partir dos sensorgramas obtidos (Figura 26) foram calculadas as constantes, cujos valores estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Constantes cinéticas determinadas para as interações estudadas entre as diferentes serinoproteases e inibidor SFTI-R

Amostra	ka (1/Ms)*	kd (1/s)x10^{-04}*	K_D (M)x10^{-06}*	K_i (µM) †
***Pool* 1**	304.2	23.3	7.64	41.65
***Pool* 2**	76.11	43.6	57.24	13.70
***Pool* 3**	587.8	52.3	8.91	8.89
***Pool* 4**	1712	5.0	0.29	3.20
***Pool* 5**	175.8	3.7	2.10	7.10

*As constantes foram determinadas utilizando-se cinco concentrações de cada enzima, realizando as medidas a 25°C em HBS-N.

†Constante calculada pela equação de Cheng-Prusoff.

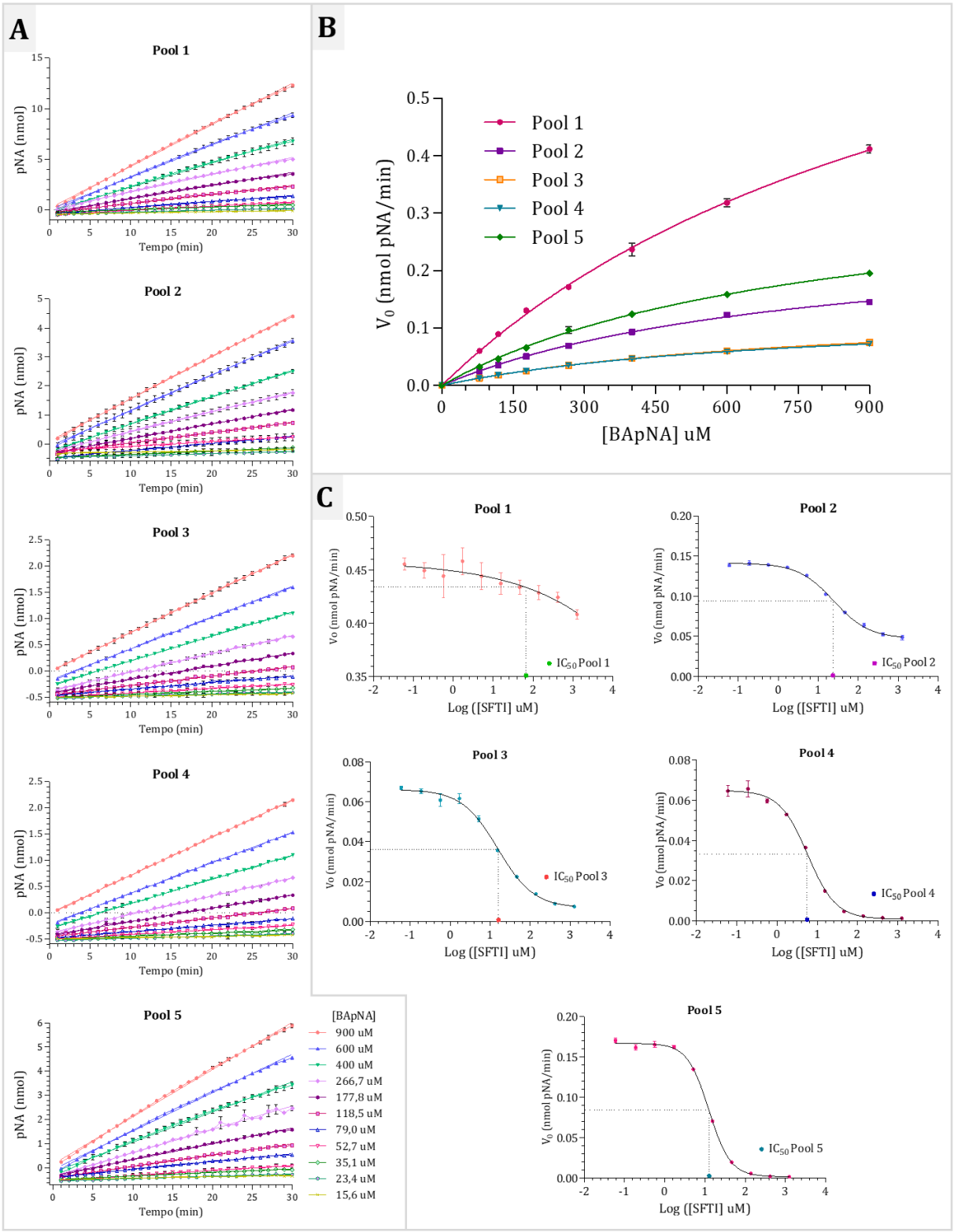

Figura 25. Determinação de constantes cinéticas para a interação entre o inibidor SFTI-R e as diferentes serinoproteases. A) Curvas de hidrólise de BApNA vs. tempo das reações catalisadas pelas diferentes serinoproteases dos *pools* 1-5, na presença das concentrações indicadas de substrato. **B)** Conjunto de curvas de V_0 vs. [substrato] determinadas para cada serinoprotease indicada, usado como base para cálculo de V_{max} e K_M das respectivas reações. **C)** Gráficos de V_0 para cada reação vs. log [SFTI-R], para determinação dos IC_{50} do SFTI-R para as reações catalisadas pelas serinoproteases dos *pools* 1-5.

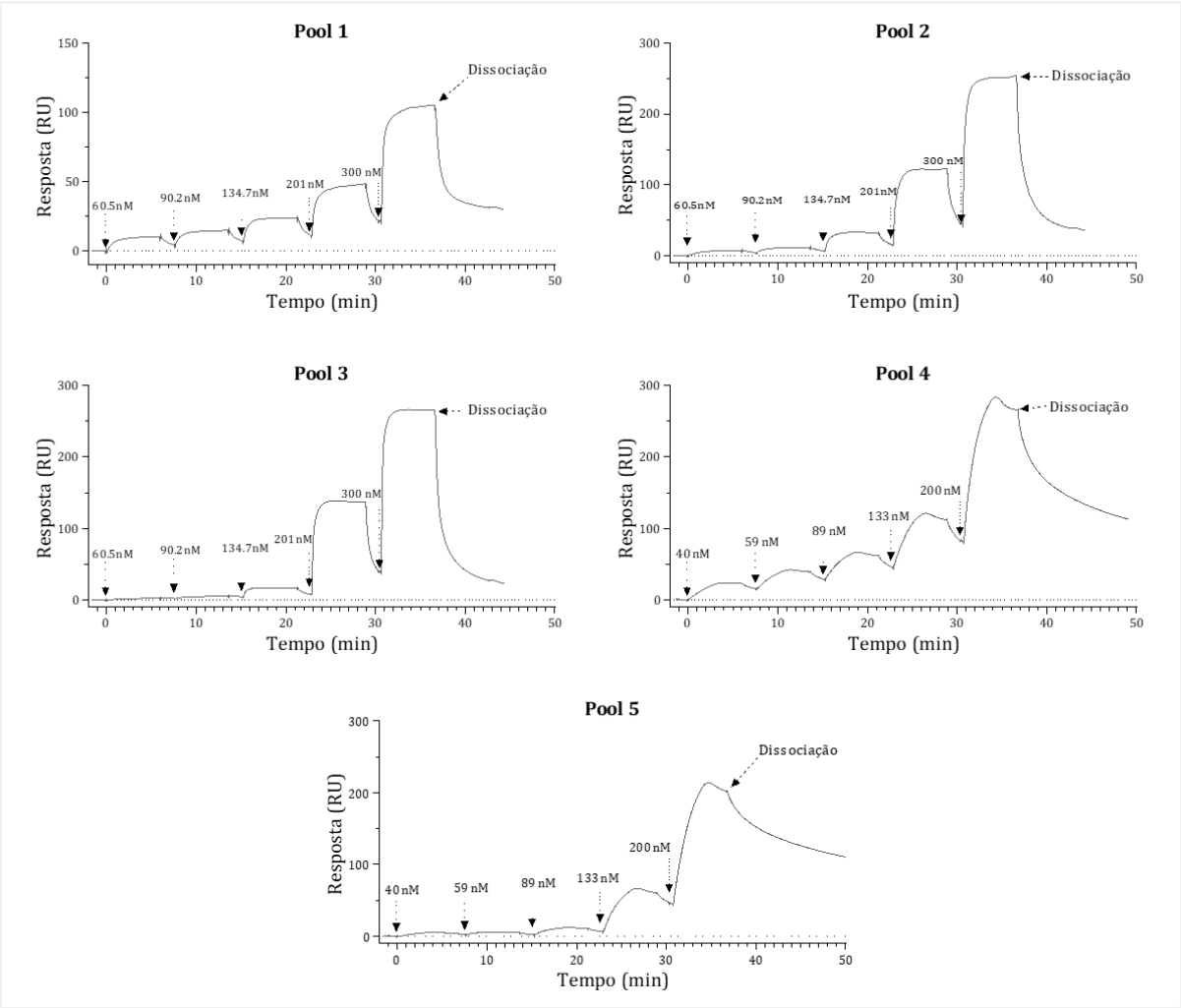

Figura 26. Determinação de constantes cinéticas ka, kd e K_D para a interação entre as diferentes serinoproteases e o inibidor SFTI-R. As constantes ka, kd e K_D foram determinadas através da metodologia *single cycle kinetics* em SPR do Biacore, para cada um dos cinco *pools* de serinoproteases obtidos do veneno de *B. jararaca*. Na Tabela 7 estão apresentados os valores obtidos para estas constantes, determinadas usando-se cinco concentrações de cada enzima, e as medidas foram realizadas a 25°C em HBS-N.

5.12 Análise comparativa das constantes cinéticas determinadas para as interações estudadas.

Para fines comparativos, na Tabela 8 estão apresentadas todas as constantes cinéticas determinadas no presente trabalho como resultado do estudo das interações entre diferentes proteases provenientes a partir do veneno de *B. jararaca* e os diversos inibidores obtidos, o crotaini, isolado a partir do soro da *C. d. terrificus*; o DM40 3 DM43, isolados a partir do soro do *D. marsupialis*; e o SFTI-R, análogo ao SFTI-1 e sintetizado mediante SPPS.

Tabela 8. Constantes cinéticas determinadas para as interações estudadas entre as diferentes proteases e inibidores

Inibidor	Enzima	ka (1/Ms)	kd (1/s)x10-04	K_D (M)x10-06	K_i (uM)
Crotaini	Bothropasina	1585	0.3	0.02	0.06
DM40	Bothropasina	1878	0.7	0.04	0.14
DM43	Bothropasina	3361	0.6	0.02	0.14
SFTI-R	Pool 4 SP	1712	5	0.29	3.2
SFTI-R	Pool 5 SP	175.8	3.7	2.10	7.1
SFTI-R	Pool 3 SP	587.8	52.3	8.91	8.9
SFTI-R	Pool 2 SP	76.11	43.6	57.24	13.7
SFTI-R	Pool 1 SP	304.2	23.3	7.64	41.65

*As constantes foram determinadas utilizando-se cinco concentrações de cada enzima, realizando as medidas a 25°C em HBS-N.

†Constante calculada pela equação de Cheng-Prusoff.

6. DISCUSSÃO

A purificação de proteínas que formam parte dos venenos de serpentes sempre tem sido um desafio devido à complexidade intrínseca destes, sendo necessários vários passos cromatográficos sucessivos com diferentes abordagens, para conseguir purificar a proteína de interesse de forma a recuperar a maior atividade possível com um bom rendimento. Com este intuito, foram adaptados ou desenvolvidos métodos para a purificação das proteínas que seriam relevantes a este trabalho, uma necessidade em vista de nossa proposta de estudo de interações entre enzimas e inibidores envolver proteínas não disponíveis comercialmente.

A metaloprotease foi purificada a partir do veneno de *B. jararaca* modificando o procedimento reportado por Oliveira et al., (2009), mediante três passos cromatográficos (Figura 1): cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose FF e duas cromatografias de exclusão molecular em Sephacryl S200. Mediante análise eletroforética por SDS-PAGE 12% (Figura 4A), determinou-se a massa molecular da enzima isolada em 54,6 kDa, segundo a banda superior observada no gel, valor próximo à massa molecular de 50 kDa reportada para a bothropasina e determinada também por SDS-PAGE (Assakura et al. 2003), e próximo também à massa molecular de 52 kDa determinada pelo mesmo método para a jararhagina (Paine et al. 1992). Podendo ser ligeiramente maior a estes dois valores devido à variações na glicosilação da proteína, uma vez que esta glicosilação diminui a ligação entre a proteína e o SDS, que resulta em uma mobilidade menor no gel e portanto uma massa molecular maior aparente (Segrest e Jackson 1972).

As proteases dos venenos estão presentes em diferentes proteoformas, ou seja, proteínas com substituição de alguns aminoácidos que não formam parte dos domínios

catalíticos, diferentes níveis de glicosilação, ou como é o caso de SVMP, podem incluso ter um arranjo diferente dos domínios que as compõem, o que resulta em variações estruturais nas proteínas maduras (Serrano et al. 2014). Isto, quando as enzimas sofrem autólises, pode resultar na origem de fragmentos de tamanho molecular entre 30 e 40 kDa, que no caso da bothropasina corresponderiam ao domínio DC formado pelo domínio tipo desintegrina e o domínio intacto rico em cisteínas (Assakura et al. 2003), e no caso da jararhagina, esses fragmentos produzidos pela autólise da enzima, corresponderiam à perda do domínio jararhagin-C (Moura-da-Silva e Paine 2013). Podendo ser ambos domínios, DC e jararhagin-C, detectados por SDS-PAGE. Em concordância com isto, a banda observada no gel (Figura 4A), com massa molecular de 28,1 kDa, pode corresponder a alguns destes domínios gerados após autólise da metaloprotease.

Após a purificação da metaloprotease e unicamente com as informações obtidas a partir da atividade proteolítica e a análise por SDS-PAGE, não era possível afirmar se a metaloprotease isolada correspondia à bothropasina, ou a jararhagina, sendo ambas duas das mais relevantes metaloproteases presentes no veneno de *B. jararaca* (Serrano et al. 2014), com massas moleculares próximas de 50 e 52 kDa, respectivamente, e não sendo diferenciáveis por eletroforese. Por tanto, realizou-se a determinação da massa intacta da metaloprotease purificada por MALDI-TOF/TOF, assim como a tripsinização da mesma para análise da sequência primaria.

A análise pelo ProteoSAFe (UCSD proteomics) da sequência dos peptídeos trípticos obtidos a partir da metaloprotease purificada, evidenciou similaridade estrutural de 10 peptídeos com a sequência indexada para a bothropasina (ID: O93523), cobrindo maiormente o domínio catalítico (resíduos 1 a 205) com 8 peptídeos, e parte do domínio rico em cisteínas (resíduos 299 a 421) com dois peptídeos (Figura 11). Porém, na amostra

analisada também foram identificados dois peptídeos com aminoácidos correspondentes à sequência da jararhagina (ID: P30431) (Figura 11). Isto não permitiu afirmar, com certeza, qual destas duas metaloproteases foi purificada, mas não foi uma surpresa, pois a distinção pela estrutura primaria entre a bothropasina e a jararhagina é um desafio porque ambas metaloproteases compartilham um 95,5% de identidade na sua estrutura primária (Moura-da-Silva e Paine 2013).

Mediante a determinação da massa molecular da enzima intacta por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF (Figura 5), onde observaram-se picos correspondentes à proteína com carga simples (48,944 m/z $(M+H)^{+}$) e carga dupla (22,967 m/z $(M+H)^{+2}$), foi determinada a massa molecular da metaloprotease purificada em 48,943 Da, massa muito próxima à massa molecular relativa de 49,870 Da reportada na literatura para a bothropasina e que foi determinada por equilíbrio na sedimentação (Mandelbaum et al. 2013). Portanto, definiu-se que a protease purificada a partir do veneno de *B. jararaca* através da metodologia descrita foi a bothropasina.

Por outro lado, o interesse em purificar e estudar um inibidor de metaloproteases a partir do soro de *C. d. terrificus*, nasceu da curiosidade em responder várias perguntas. Duas dessas perguntas foram: 1)Se a partir do soro ou plasma das serpentes do gênero *Bothrops* tem sido isolados inibidores de metaloproteases como o BJ46a de *B. jararaca* (Valente et al. 2001), o BaSAH de *B. asper* (Borkow, Gutierrez e Ovadia 1995), e, o BaltMPI de *B. alternatus* (Palacio et al. 2017), e de serpentes da família *Viperidae*, a qual pertencem todas as espécies citadas incluindo a *C. d. terrificus*, tem sido isolados os inibidores HSF de *Trimesurus flavoridis* (Omori-Satoh et al. 1972), e TMI de *Trimesurus mucrosquamatus* (Huang, Chow e Chiou 1999), será que do soro de cascavel também poderá ser isolado um

ou vários inibidores de metaloproteases?; e 2)E será que existem inibidores de metaloproteases no soro da *C. d. terrificus*? Mesmo levando em conta que, o veneno de *C. d. terrificus* tem só uma baixa porcentagem (4%) de SVMPs (Georgieva et al. 2010), enquanto que o veneno botrópico tem no mínimo um 32% de estas enzimas (Fox e Serrano 2008b).

Diante destes questionamentos, realizamos a purificação do inibidor de metaloproteases a partir do soro de *C. d. terrificus* orientando biologicamente o processo cromatográfico, mediante a inibição da atividade proteolítica da bothropasina previamente purificada, sobre o substrato fluorogênico Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr, selecionando assim em cada etapa as frações de interesse. A escolha dos mecanismos de separação utilizados em cada etapa, foi baseada nas características que possuem os inibidores de metaloproteases previamente isolados a partir do soro ou plasma de serpentes. De modo geral, estes inibidores são glicoproteínas de caráter ácido, conservando sua capacidade inibitória em uma ampla faixa de pH, sendo termoestáveis, com pontos isoelétricos menores a 5,4, e tendo massas moleculares entre 40 a 95 kDa (Perales et al. 2005, Neves-Ferreira et al. 2010).

Desta maneira, foi obtido um inibidor de metaloproteases a partir do soro da *C. d. terrificus*, mediante três passos cromatográficos (Figura 2): cromatografia de troca iônica fraca em DEAE Sepharose FF, seguida de cromatografia de troca iônica forte em MonoQ e finalizando com uma cromatografia em fase reversa em coluna Pro-RPC. A análise por SDS-PAGE do inibidor purificado revelou uma banda única com massa de 54,2 kDa (Figura 4B), e o nome dado para ele foi: **crotaini** derivado da espécie da serpente (**crota-**) e da atividade de inibição (**-ini**) sobre as metaloproteases.

Esta massa molecular do crotaini se encontra dentro da faixa usual para estes inibidores, assemelhando se às massas moleculares de outros inibidores de metaloproteases isolados a partir do soro ou plasma de serpentes: 46 kDa do BJ46a (Valente et al. 2001), 66 kDa do BaSAH (Borkow et al. 1995), 61 kDa do BaltMPI (Palacio et al. 2017), 48 kDa do HSF (Omori-Satoh et al. 1972), e 47 kDa do TMI (Huang et al. 1999).

A massa molecular do crotaini também foi determinada mediante espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF. No espectro da Figura 6 observaram-se os picos com m/z de 45.931 $(M+H)^{+1}$ e 22.993 $(M+H)^{+2}$, indicado assim uma massa de 45,930 Da para o crotaini, massa de valor menor à determinada pela técnica eletroforética, 54,2 kDa (Figura 4), esta diferencia se deve principalmente a dois fatores: o primeiro deles, a precisão na determinação, a qual é maior na determinação por espectrometria de massas, pois na eletroforeses a massa molecular é aparente e se vê afetada, por exemplo, pelo nível de glicosilação da proteína (Segrest e Jackson 1972), e o segundo, que pela espectrometria de massas se mede uma propriedade intrínseca da proteína, a sua massa, mediante a medida da relação massa/carga (m/z) da mesma (Rhodes, Bossio e Laue 2009). Salientando que esta diferença entre as massas moleculares determinadas pelas duas técnicas foi observada também com os outros inibidores acima mencionados.

O seguinte passo na caracterização do crotaini, foi a produção e sequenciamento de peptídeos trípticos e a sua análise pelo MASCOT e ProteoSAFe. Após sequenciados, foram identificados 8 peptídeos (Tabela 4) com similaridade estrutural às sequencias depositadas em bases de dados para inibidores de metaloproteases provenientes também do soro de serpentes. Na Figura 9 se observa o alinhamento por identidade realizado no BLAST dos peptídeos com as sequencias dos seguintes inibidores: os fatores cHLP-A e cHLP-B são fatores anti-hemorrágicos isolados a partir do soro da serpente *Gloydius*

brevicaudus por (Aoki et al. 2009); o fator HSF é um fator anti-hemorrágico isolado a partir do soro da serpente *Protobothrops flavoviridis* por (Omori-Satoh et al. 1972); o fator BJ46a é um fator anti-hemorrágico isolado a partir do soro da serpente *Bothrops jararaca* por (Valente et al. 2001); e o fator BaltMPI é um fator anti-hemorrágico isolado a partir do soro da serpente *Bothrops alternatus* por (Palacio et al. 2017).

Todos estes inibidores com os quais os peptídeos trípticos do crotaini apresentaram similaridade estrutural, provêm do soro de serpentes que pertencem à família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*, família e subfamília às quais também pertence a *C. d. terrificus*. Quer dizer, além da similaridade estrutural do crotaini com estes inibidores, pode-se considerar que sejam homólogos pois, ao pertencer à mesma família>subfamília, eles compartilham um ancestral comum que divergiu evolutivamente em algum ponto, gerando assim variações nas sequências para estas proteínas que exibem atividade inibitória sobre as metaloproteases (Koonin e Galperin 2003). Assim mesmo, o alinhamento resultante entre todas as sequencias da indicio dos resíduos de aminoácidos altamente conservados nestes inibidores ao longo da família *Viperidae*, assim como as regiões do inibidor crotaini, às quais pertencem cada um dos peptídeos sequenciados (Figura 9). Consequentemente, ao realizar o alinhamento destes peptídeos sequenciados do crotaini unicamente com as sequencias dos inibidores BJ46a e BaltMPI, que provêm de serpentes da mesma família/subfamilía, e estão em estreita relação geográfica com a *C. d. terrificus*, observa-se uma maior similaridade na sequência de aminoácidos (Figura 10). Com as informações estruturais obtidas para o crotaini e considerando que, todos os inibidores isolados a partir do soro/plasma de serpente até o momento pertencem à superfamília das cistatinas (Neves-Ferreira et al. 2010), é factível afirmar que o crotaini faz parte também desta superfamília.

Além da purificação de um novo inibidor de metaloproteases a partir do soro de *C. d. terrificus*, o crotaini, que não tinha sido previamente identificado, purificado ou reportado na literatura; foram purificados dos inibidores de metaloproteases já conhecidos da família supergen das imunoglobulinas. Estes inibidores, DM40 e DM43, foram purificados a partir do soro do marsupial *Didelphis marsupialis*, comumente conhecido como gambá. Para sua purificação adaptou-se a metodologia previamente descrita por (Neves-Ferreira et al. 2000), conseguindo reduzir o processo de purificação a duas etapas cromatográficas: cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose FF, seguida de cromatografia de hidrofobicidade em Phenyl Sepharose CL 4B, através das quais se obtiveram os inibidores com alta pureza (Figura 3).

Uma vez purificados, foi realizada a determinação da massa molecular de ambos inibidores por SDS-PAGE e por espectrometria de massas em MALDI-TOF/TOF. Mediante o método eletroforético foram determinadas massas de 41,1 kDa para o DM40 e 44,6 kDa para o DM43 Figura 4C e D, respectivamente. Enquanto que nos espectros obtidos para os inibidores intactos por espectrometria de massas, foram determinadas massas moleculares de 40,001 Da para o DM40 (Figura 7), e de 42,636 Da para o DM43 (Figura 8). Os valores determinados por SDS-PAGE foram menores que os reportados por Neves et al., (2000); 44.8 kDa para o DM40 e 47.3 kDa para o DM43, porém esta diferença observada é atribuível às variações na glicosilação destes inibidores, o qual influencia consideravelmente a massa molecular aparente determinada (Segrest e Jackson 1972). Por outro lado, os valores determinados por MALDI-TOF/TOF foram muito próximos aos reportados também por Neves et al., (2002): 40,318 Da para o DM40 e 42,373 e 43,010 Da para o DM43. Resultando estes últimos dois valores reportados para o DM43 das variações nos níveis de glicosilação do DM43.

A partir da determinação da massa molecular dos inibidores DM40 e DM43 embora tivéssemos certeza da identidade dos inibidores isolados, também foi realizada a tripsinização destes para estudar a similaridade sequencial entre os inibidores purificados e a sequência depositada nas bases de dados para o DM43, pois a sequência do DM40 não tem sido indexada. Na Tabela 4 estão enumerados os peptídeos trípticos dos inibidores DM40 e DM43 que, através do ProteoSAFe, exibiram identidade sequencial com o DM43. E na Figura 12 apresenta-se o alinhamento destes peptídeos com a sequência de aminoácidos do DM43. Dos três peptídeos do DM40 que apresentaram similaridade com esta sequência, dois se sobrepõem na segunda região sublinhada no alinhamento (Figura 12), e o outro está próximo à região N-terminal da sequência. Esta similaridade sequencial do DM40 com o DM43 não é inesperada, pois estes dois inibidores apresentam similaridade na composição de aminoácidos (Neves-Ferreira et al. 2000).

Ao passo que do inibidor DM43 purificado, foram identificados 10 peptídeos que apresentam similaridade estrutural com a sequência depositada em bancos de dados para o mesmo inibidor. Observando no alinhamento (Figura 12) que os peptídeos identificados (Tabela 4) se alinham uniformemente ao longo da sequência, abrangendo regiões do N-terminal, do médio e do C-terminal. Isto reafirma que os inibidores isolados do *Didelphis marsupialis* foram o DM40 e DM43.

Assim, a seguinte etapa após a purificação e caracterização parcial destas proteínas, consistiu no estudo e caracterização cinética da interação entre a metaloprotease e os inibidores purificados. Mas, por quê seria interessante aprofundar no estudo destas interações?

Desde há alguns séculos, naturistas têm estado cativados pelo dano causado pelos venenos de serpentes tanto ao homem, quanto a outros animais. Prova disto são os extensos tratados médicos escritos desde o final do século XVII e que agora fazem parte do arquivo digital de domínio público (Internet Archive, 2018). Não escapou à observação destes naturistas a imunidade que estas serpentes mostravam respeito a seus próprios venenos. Um dos primeiros trabalhos indexados ao respeito no *Web of Science* da *Clarivate Analytics*, é o trabalho de (Flexner e Noguchi 1903) sobre os venenos das serpentes e seus soros, onde mesmo não sendo o foco do seu trabalho, eles registram a neutralização dos efeitos deletérios do veneno de duas espécies de serpentes, pelo soro das mesmas. Já no trabalho de revisão realizado por Noguchi (1909), há um capítulo completo de revisão da literatura da época sobre a imunidade que as próprias serpentes e alguns mamíferos e pássaros exibiam frente ao veneno ofídico. Por exemplo, já começava a ser evidente que existia uma relação filogenética entre a imunidade interespécie das serpentes, assim como uma correlação de presa ou predador entre as serpentes e os outros animais com certa imunidade ao veneno destas. E mesmo não sendo claro naquele momento o mecanismo pelo qual se dava esta imunidade, nem sendo acertadas as hipóteses formuladas para explicar o fenómeno, o conteúdo do trabalho dá conta do interesse prematuro no âmbito cientifico por desvendar a ciência detrás do envenenamento e a imunidade frente a este, considerando o assunto chave para resolver ou melhorar o problema das terapias para tratar os envenenamentos.

Atualmente, segue-se considerando que o estudo destes inibidores de serpentes pode, não só auxiliar na origem das terapias auxiliares à soroterapia (Asega et al. 2014, Fox e Gutierrez 2017), como também contribuir para um maior entendimento a respeito dos mecanismos moleculares das enzimas, não só presentes no veneno, senão também de

enzimas pertencentes às mesmas famílias, que fazem parte de processos biológicos normais e patológicos nos humanos (Perez e Sanchez 1999).Em comparação ao conhecimento que tinham Noguchi e seus colegas há um século, hoje em dia tem se avançado bastante, especialmente com o desenvolvimento das ciências ômicas e a exploração farmacêutica dos venenos (Casewell et al. 2013, Herrera et al. 2018), assim como no isolamento de vários inibidores séricos de metaloproteases e a sua caracterização bioquímica (Neves-Ferreira et al. 2010). Porém, ainda persistem alguns desafios no estudo destes inibidores, pois mesmo com um maior conhecimento acerca da suas características físico-químicas, ainda os mecanismos moleculares da atividade inibitória sobre as proteases do veneno não tem sido completamente elucidados (Bastos et al. 2016), e mesmo sabendo que, a inibição se dá pela ligação não covalente entre o inibidor e a protease, e existindo alguns mecanismos de inibição descritos para outras metaloproteases, ainda são amplamente desconhecidas tanto as estruturas tridimensionais dos inibidores e as estruturas tridimensionais do complexo inibidor – protease; quanto a termodinâmica que governa estas interações (Neves-Ferreira et al. 2017). E esta falta de conhecimento mais profundo acerca destas interações entre inibidores de metaloproteases do veneno e as SVMPs, é o que não tem possibilitado, por exemplo, o desenvolvimento de terapias clinicas baseadas nestes inibidores (Bastos et al. 2016). Por conseguinte, uma vez purificados os inibidores crotaini, DM40 e DM43, e a metaloprotease, bothropasina, direcionamos nosso trabalho à caracterização da cinética que rege a interação entre estas proteínas.

O passo inicial da caracterização, consistiu na imobilização covalente dos inibidores na superfície do chip CM5, da série S. O crotaini foi ligado diretamente às cadeias carboxílicas do chip, enquanto que devido ao caráter fortemente ácido dos inibidores

DM40 e DM43, a ligação direta não foi possível, utilizando-se uma abordagem de captura dos inibidores biotinilizados sobre avidina ligada covalentemente na superfície, como descrito no item 4.12. Em um trabalho publicado anteriormente, no qual os autores estudam a interação do inibidor DM43 com a metaloprotease do veneno de *B. jararaca,* jararhagina, para contornar o problema da ligação do inibidor no chip, foi realizada a ligação covalente de um anticorpo monoclonal anti-jararhagina, capturando assim a metaloprotease antes de ocorrer a injeção do inibidor (Brand et al. 2012).

Posteriormente, sobre os inibidores imobilizados foi injetada a bothropasina. Nos sensorgramas obtidos tanto com o crotaini (Figura 13) quanto com o DM40 e DM43 (Figura 17A) observou-se ligação entre as proteínas, exibindo afinidade entre a metaloprotease e os inibidores, com curvas que evidenciaram uma rápida associação, porém com o crotaini observou-se uma curvatura diferente à curvatura obtida com os inibidores DM40 e DM43. Esta variação na curva pode ser atribuída a variações na quantidade de inibidor disponível na superfície do chip para interagir com a bothropasina, resultando em relações metaloprotease(analito)/inibidor(ligante) diferentes, pois ao ligar uma proteína covalentemente mediante acoplamento amina, a reação pode ocorrer de forma tal que a região necessária para a interação fique indisponível por impedimento estérico (Myszka 1997, Myszka 1999), portanto a quantidade de inibidor imobilizada é maior que a quantidade de inibidor na interação, no qual a curva obtida na fase de associação é menos convexa. Isto foi observado também em um experimento onde sobre o inibidor imobilizado (ligante) foram injetadas metaloproteases (analito) em concentrações de 0.3 e 1.0 uM, obtendo curvas de associação menos convexas, quando na relação analito/ligante a concentração do primeiro foi menor (Asega et al. 2014).

Enquanto a fase de dissociação da interação entre a bothropasina e os três inibidores estudados, com todos eles, crotaini (Figura 13), DM40 e DM43 (Figura 17A), observaram-se curvas com declínio muito tênue e prolongado, resultado em conformidade ao observado anteriormente respeito à formação do complexo metaloprotease/inibidor, que se dá por ligações reversíveis e não covalentes fortes, o que resulta na perda da atividade da metaloprotease sem envolver a proteólise de nenhuma das proteínas do complexo formado (Perales et al. 2005, Neves-Ferreira et al. 2010).

E mesmo ainda não conhecendo o mecanismo preciso da inibição (Neves-Ferreira et al. 2017), também se conhece que nesta interação do inibidor com a metaloprotease está envolvido o domínio catalítico da protease, pois estes inibidores de metaloproteases que tem sido isolados do soro de serpentes ou animais resistentes não interagem nem com a atrolisina C nem com a jararhagina-C, metaloproteases de venenos de serpentes carentes do domínio catalítico (Perales et al. 2005).

Assim, sabendo que na interação está envolvido o domínio catalítico da metaloprotease, e que o zinco (Zn^{2+}) é fundamental para a sua atividade, concedendo estabilidade à estrutura proteica mediante a sua coordenação com três histidinas do sitio catalítico (Stocker e Bode 1995, Fox e Serrano 2008b), e sabendo que quando o íon metálico é retirado da estrutura proteica, por exemplo mediante quelação, a estrutura tridimensional da metaloprotease se desintegra, perdendo assim a sua atividade proteolítica (Fox e Serrano 2010), quisemos avaliar se existia mudanças na interação estudada em condições nativas, ao submeter a bothropasina à ação de um agente quelante.

Desta forma, realizamos a incubação da metaloprotease com agentes quelantes, fenantrolina ou EDTA, avaliando posteriormente a interação entre a bothropasina e os

inibidores imobilizados sobre o chip. Independentemente do agente utilizado na quelação, a bothropasina utilizada nos experimentos de SPR perdeu a sua atividade proteolítica, como se evidencia nas figuras 15 e 17B, comparando-a com as metaloproteases controle que mantiveram atividade sobre o substrato fluorogênico Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr.

Interessantemente, ao avaliar a interação entre a bothropasina após a quelação e os inibidores mediante SPR, observamos sensorgramas diferentes. Na interação com os inibidores DM40 e DM43 (Figura 17A) não foi observada nenhuma associação entre a metaloprotease e os inibidores após a quelação, sendo o declive negativo da curva o resultado de uma módica interação inespecífica da bothropasina com a ovoalbumina controle na célula de referência. Enquanto que entre a bothropasina quelada e o crotaini (Figura 14), mesmo sendo menor à associação em condições nativas, se foi observada associação entre a metaloprotease quelada e o inibidor. Isto gera várias perguntas a respeito da interação: os inibidores DM40 e DM43 precisam de um domínio catalítico integro para formar o complexo com a bothropasina e o crotaini não?; o crotaini, a diferença dos DM40 e DM43, interage com outros domínios da bothropasina além do domínio catalítico? Como acontece com alguns substratos destas metaloproteases, como a colagenase, que interage também com os domínios tipo desintegrina e ricos em cisteinas além do catalítico (Moura-da-Silva e Paine 2013), mas sem sofrer proteólise?

Considerando que, mesmo estando classificados em três famílias diferentes, as informações conhecidas sobre estes inibidores séricos de SVMPs são poucas, não seria improvável que o seu mecanismo de ação e organização estrutural fosse diferente, exibindo assim variações ao momento de interagir com as metaloproteases sobre as quais exercem inibição. Incluso, maiores informações respeito a estes inibidores permitiria

perfeiçoar a sua classificação, pois eles têm sido classificados principalmente por similaridade na sequências primárias, desta forma os inibidores de SVMPs isolados a partir do soro de serpentes pertencem à superfamília das cistatinas, mesmo que a diferença dos outros membros desta família, estes SVMPIs não exercem atividade proteolítica sobre, nem inibem, as cisteíno-proteases (Neves-Ferreira et al. 2010)

Adicional à avaliação da ligação entre os inibidores e a bothropasina, realizou-se a caracterização da cinética que rege a afinidade destas interações mediante o módulo de *single cycle kinetics* do Biacore T200, obtendo sensorgramas contínuos sem períodos de regeneração entre as concentrações crescentes de metaloprotease injetada sobre os inibidores imobilizados, e um único período extenso de dissociação após a última injeção da metaloprotease. A partir dos sensorgramas obtidos com o crotaini (Figura 16F), e com os inibidores DM40 e DM43 (Figura 18D), foram determinadas: a constante de associação, ka; a constante de dissociação, kd; e, a constante de dissociação no equilíbrio, K_D; para cada interação, após ajustar as curvas a um modelo de interação 1 para 1, visto que foi determinado que a relação molar na interação entre os inibidores e a bothropasina apresenta esta estequiometria (figura 16E e figura 18C). No caso dos inibidores DM40 e DM43 purificados neste trabalho, a relação estequiométrica da interação foi igual à reportada previamente (Neves-Ferreira et al. 2002, Brand et al. 2012), enquanto que para os inibidores isolados a partir do soro de serpentes, tem sido reportada uma estequiometria de 2 metaloproteases para 1 BJ46a (Valente et al. 2001), e de 1 para 1 no caso do HSF (Deshimaru et al. 2005).

Os valores obtidos para as constantes cinéticas da interação da bothropasina com o crotaini e os inibidores DM40 e DM43, estão apresentados na tabela 5 e na tabela 6, respectivamente. Estes valores determinados estão dentro dos limites técnicos

específicos do Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences, 2019), e dentro dos valores que usualmente conseguem ser medidos com exatidão para as constantes de associação, Ka, (10^3 a 10^7 $M^{-1}sec^{-1}$) e de dissociação (10^{-5} a 1 sec^{-1}) (Murphy, Jason-Moller e Bruno 2006). Porém, existe uma incerteza na determinação da kd devido à falta de decaimento observado na curva na fase de dissociação, como resultado da estabilidade do complexo entre os inibidores e a bothropasina (Brand et al. 2012).

Previamente ao estudar a interação do DM43 com a jararhagina mediante SPR, determinaram-se os seguintes valores para as constantes cinéticas: ka = 3.54 x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$; kd = 1.16 x $10^{-5}s^{-1}$ e K_D = 0.33 nM (Brand et al. 2012). Observando-se também uma grande afinidade entre o inibidor e a metaloprotease, com uma rápida associação entre as duas moléculas, e a formação de um complexo estável de dissociação lenta, que exibe uma constante de dissociação <10^{-3}/s, característico deste tipo de inibidores (Murphy et al. 2006). Também com a jararhagina foi estudada a interação do BJ46a mediante SPR, sendo os valores reportados para as constantes: ka = 5.76 x 10^3 $M^{-1}s^{-1}$, kd = 7.68 x $10^{-5}s^{-1}$, e K_D = 13.8 nM (Neves-Ferreira et al. 2017), valores bastante similares aos determinados para a interação entre o crotaini e a bothropasina. Em conjunto, o valor obtido para a constante de dissociação no equilíbrio (K_D) para as interações entre a bothropasina e os inibidores estudados, e que resultou de uma rápida associação/lenta dissociação, expressam que existe uma alta afinidade entre os inibidores e a metaloprotease , e que para uma inibição significativa não há necessidade da presença do inibidor em um excesso molar (Neves-Ferreira et al. 2017).

A capacidade inibitória destes inibidores sobre a metaloprotease, além de ser avaliada através de K_D, também foi avaliada mediante o cálculo da constante de inibição K_i pela aplicação da equação de Cheng-Prusoff (Auld et al. 2004). Os valores obtidos para

a interação do crotaini, e de DM40 e DM43, com a bothropasina se mostram na tabela 5 e na tabela 6, respectivamente. Não se encontram reportados na literatura valores para esta constante, K_i, com outros inibidores de SVMPs até agora estudados, mas se entende que a ordem de grandeza dos valores determinados para o K_i e o K_D denotam uma alta afinidade dos inibidores pela metaloprotease (Bieth 1995), além de não ser necessário um excesso molar do inibidor para exercer a inibição (Neves-Ferreira et al. 2017), e uma associação rápida com a enzima; o que é muito conveniente desde o ponto de vista biológico, ao pensar nestes inibidores como geradores de resistência aos efeitos deletérios das SVMPs.

A interação entre os inibidores DM40 e DM43 com os componentes do veneno de *B. jararaca* também foi avaliada desde um ângulo diferente mediante cromatografia de afinidade. Sobre as resinas de afinidade sintetizadas com os inibidores DM40 e DM43, como descrito no item 4.11, foram passadas amostras de veneno de *B. jararaca*, realizando a eluição das proteínas que ligaram nelas com NaCl 0,5 M e guanidino HCl 3M (figura 19). Ao avaliar a atividade proteolítica destas frações após ter retirado o sal mediante filtração em gel por resina Sephadex G25, observou-se que unicamente as frações eluídas com guanidino em ambas colunas conseguiram hidrolisar o substrato fluorogênico Abz-GPQGLAGQ-NO_2Tyr (figura 19). Ao analisar o perfil eletroforético das etapas da cromatografia de afinidade com cada uma das resinas (figura 20), se observa em cada uma das linhas 1 do gel o perfil eletroforético da amostra inicial aplicada nas colunas, que apresenta uma banda forte na região entre 45 e 66 kDa, a qual corresponde as metaloproteases. Está banda desaparece completamente na linha 2 do gel correspondente à coluna com resina DM43 e diminui consideravelmente na linha 2 do gel correspondente à coluna com a resina DM40, enquanto que o restante das bandas observadas na linha 1 também são observadas na linha 2, o que indica que após passar o veneno de *B. jararaca*

pelas resinas as metaloproteases ficaram retidas nestas. Observa-se no perfil eletroforético das linhas 3 do gel, as proteínas que ficaram retidas nas resinas e que foram eluídas com NaCl 0,5 M. O perfil obtido indica que ambas resinas interagiram com o mesmo grupo de proteínas do veneno, e que algumas destas foram concentradas na coluna, sendo proteínas que se encontram em menor quantidade quando comparadas às bandas predominantes do perfil obtido com a amostra inicial (linha 1), porém nenhuma destas proteínas eluídas nesta etapa apresentou atividade proteolítica sobre o substrato fluorogênico (figura 19). Por outra parte, as frações eluídas com guanidino, que hidrolisaram o substrato, exibiram no perfil eletroforético uma banda predominante próxima à região de 30 kDa (linhas 4 Figura 20). A ausência neste perfil de bandas na região das metaloproteases do veneno de *B. jararaca*, que era o esperado uma vez que foi observada atividade proteolítica, e a presencia da banda nesta região, pode indicar a presença do domínio catalítico de metaloproteases, que possivelmente devido às condições fortes da eluição poderia ter sofrido processo de autólise no qual os outros domínios foram perdidos, mas o domínio catalítico foi conservado na proteína madura, fenômeno que acontece por exemplo com metaloproteases da classe P-I (Serrano et al. 2014). Esta abordagem mediante cromatografia de afinidade utilizando os inibidores como “armadilha” para reter proteínas pelas quais tem afinidade dentro de misturas complexas como o veneno, permite também explorar interações com proteínas que não tem sido amplamente estudadas devido a que se encontram em baixa proporção nos venenos, pois mediante esta técnica é possível enriquecer amostras especificas destas mediante a sua retenção por afinidade.

Além disto, a avaliação entre o crotaini e os componentes do veneno de *C. d. terrificus* foi feita com o intuito de encontrar possíveis interações do inibidor com componentes do veneno da própria serpente, apesar de não haver descrição de metaloproteases no veneno da *C. d. terrificus*. Contudo, há sugestões de que inibidores no plasma de serpentes peçonhentas possa ser uma explicação plausível de mecanismos autoprotetores contra seus próprios princípios tóxicos (Omori-Satoh 1977). Nos sensorgramas obtidos (figura 22) ao avaliar a interação entre o crotaini e os *pools* previamente obtidos do veneno de *C. d. terrificus* (figura 21), se observa que houve interação detectável por SPR que não foi totalmente abolida por quelação com EDTA, pois a curva obtida com os *pools* tratados com o quelante é quase idêntica à curva obtida com os *pools* sem tratamento quelante que também passaram pelas filtrações em gel, sendo ambas curvas menores à curva obtida com os *pools* que não foram filtrados nem tratados com quelante. Interessantemente, este resultado é similar ao observado ao estudar nas mesmas condições a interação crotaini – bothropasina (Figura 14), o que pode ser indício de que o crotaini ao inibir as metaloproteases interage com outros domínios além do catalítico.

Da mesma forma, ao comparar a forma das curvas nos sensorgramas (Figura 22) obtidos com os *pools* 1 e 2, é evidente que a interação se está dando com diferentes proteínas, dado que com o *pool* 2 se observa uma associação muito mais rápida e uma dissociação mais acentuada, enquanto que com o *pool* 1 a associação, mesmo sendo rápida foi menor, e a dissociação exibe um comportamento mais semelhante à dissociação observada entre as SVMPs e os SVMPIs. Os resultados mostrados na figura 22 deixam ainda aberta a possibilidade de haver metaloproteases no veneno crotálico que não foram revelados por ensaios enzimáticos ou toxinológicos.

Assim, além de estudar as interações entre inibidores séricos de metaloprotease e as metaloproteases do veneno de *B. jararaca*, foi realizada uma análise sobre a interação entre serinoproteases do mesmo veneno com o inibidor sintético de serinoproteases, SFTI-R, aplicando as mesmas técnicas utilizadas no estudo dos SVMPIs. Após obter cinco *pools* de serinoproteases a partir do veneno de *B. jararaca*, como descrito no item 5.11.1, foram realizados experimentos de cinética enzimática (Figura 25) que permitiram calcular o K_i da interação entre o inibidor SFTI-R e os diferentes *pools* de serinoproteases estudados (tabela 7).

Posteriormente, o inibidor SFTI-R foi imobilizado na superfície do chip (item 4.12), e avaliou-se a sua interação com cada um dos *pools* de serinoproteases obtidos. Nos sensorgramas da figura 24 observa-se que existe interação do inibidor com proteínas de todos os *pools* avaliados, evidenciando que proteínas que apresentaram uma associação mais rápida, apresentaram também uma rápida dissociação, enquanto que proteínas que se associaram de forma mais lenta, também exibem uma dissociação mais lenta do inibidor, o que denota que mesmo interagindo com várias das proteínas presentes nos *pools*, a afinidade e o mecanismo de interação e, portanto de inibição, entre o SFTI-R e estas pode se dar de maneira diferente (Myszka 1997, Christopeit et al. 2013).

Após a avaliação qualitativa da ligação entre o SFTI-R e proteínas dos *pools* de serinoproteases por SPR, foram determinadas mediante a mesma técnica utilizando o método de *single cycle kinetics* as constantes cinéticas ka, kd e K_D, para cada uma das interações. A partir dos sensorgramas obtidos (Figura 26) foram calculadas as constantes, cujos valores estão apresentados na tabela 7. Os valores obtidos para todas as constantes com o *pool* 1 são incertos porque este *pool* apresentou o comportamento mais heterogêneo, se bem o perfil eletroforético deste *pool* (figura 23D linha 1) não aparenta

ser mais complexo que o perfil dos outros *pools* estudados, a curva obtida na determinação do IC_{50} (Figura 25C) pode ser o resultado de uma pobre inibição, indicando que as proteínas de este *pool* requerem concentrações maiores para serem inibidas pelo SFTI-R.

No entanto, ao analisar os valores das constantes obtidas para os *pools* 2 a 5 (Tabela 7) se observa uma relação proporcional entre o K_i e o K_D, onde menor o valor de K_i, menor o valor de K_D quando comparados aos valores determinados para todos os *pools* 2 a 5. Ao observar as curvas de IC_{50} (Figura 25C) conjuntamente com o valor de K_i observa-se que menor o valor do K_i, mais acentuada a pendente da curva, e portanto melhor o inibidor para a protease em estudo. Logicamente, estes dados não podem ser considerados de forma absoluta uma vez que as avaliações estão sendo realizadas com *pools* de proteínas e não amostras puras, mas permitem colocar em evidência as relações entre as constantes cinéticas e o potencial destes métodos para caracterizar termodinamicamente sistemas de protease-inibidor. Igualmente, com os valores determinados para K_D e os sensorgramas se observou uma relação proporcional. De modo geral, menor o valor de K_D, e portanto de K_i, a dissociação das proteínas do inibidor SFTI-R se dá de forma mais lenta, enquanto que maiores os valores de K_D e K_i, a dissociação acontece de forma mais rápida.

Embora estes resultados devam ser interpretados com prudência, por terem sido gerados a partir de interações entre *pools* de serinoproteases e o inibidor, estes em geral oferecem informações úteis para uma melhor compreensão sobre as interações entre estes inibidores e as proteases do veneno. E em conjunto com as constantes cinéticas obtidas para as interações entre os inibidores de metaloproteases e a bothropasina, contribuem a um maior entendimento sobre estas moléculas, aportando informação

valiosa que uma vez complementada com outras informações estruturais, irão permitir desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na interação e, consequentemente, o desenvolvimento de terapias e ferramentas moleculares baseados nestes inibidores.

7. CONCLUSÕES

Para a realização do presente trabalho foi isolada a bothropasina a partir do veneno de *B. jararaca*. Da mesma maneira foram isolados o inibidor crotaini, nunca antes descrito ou identificado, a partir do soro de *C. d. terrificus*, e os inibidores DM40 e DM43 a partir do soro do *D. marsupialis*.

Para caracterizar cineticamente as interações destes inibidores com a bothropasina, foram realizados experimentos de cinética enzimática e de interação em tempo real mediante estudos por *single cycle kinetics* em Biacore T200. As constantes cinéticas determinadas foram: ka = 1585 $M^{-1}s^{-1}$; kd = 0.3 x 10^{-4} s^{-1}; K_D = 0.02 x 10^{-06} M e K_i = 0.06 µM, para a interação crotaini - bothropasina; ka = 1878 $M^{-1}s^{-1}$; kd = 0.7 x 10^{-4} s^{-1}, K_D = 0.04 x 10^{-06} M e K_i = 0.14 µM para a interação DM40 – bothropasina; e ka = 3361 $M^{-1}s^{-1}$, kd = 0.6 x 10^{-4} s^{-1}, K_D = 0.02 x 10^{-06} M e K_i = 0.14 µM para a interação DM43 – bothropasina. Estes valores de K_D e K_i determinados, em conjunto com os outros dados obtidos, indicam que existe uma alta afinidade entre estes inibidores e a metaloprotease.

Além disto, os sensorgramas obtidos ao estudar a interação após ter submetido a metaloprotease a tratamento com quelante, permitem pensar que entre o inibidor crotaini e os inibidores provenientes do *D. marsupialis*, existem diferenças no mecanismo de inibição ao interagir com domínios diferentes da bothropasina.

Finalmente, estas caracterizações cinéticas, com proteínas purificadas ou contidas em misturas complexas, permitiram a obtenção de informações valiosas que ajudam a entender melhor as interações entre proteases e seus inibidores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, G., J. Grothusen, H. Zepeda & R. J. Schwartzman (1988) Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus-durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon,* 26**,** 953-960.

Altschul, S., T. Madden, A. Schaffer, J. H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. Lipman (1998) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Faseb Journal,* 12**,** A1326-A1326.

Aoki, N., M. Deshimaru, K. Kihara & S. Terada (2009) Snake fetuin: Isolation and structural analysis of new fetuin family proteins from the sera of venomous snakes. *Toxicon,* 54**,** 481-490.

Asega, A. F., A. K. Oliveira, M. C. Menezes, A. G. C. Neves-Ferreira & S. M. T. Serrano (2014) Interaction of Bothrops jararaca venom metalloproteinases with protein inhibitors. *Toxicon,* 80**,** 1-8.

Assakura, M. T., C. A. Silva, R. Mentele, A. C. M. Camargo & S. M. T. Serrano (2003) Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of Bothrops jararaca. *Toxicon,* 41**,** 217-227.

Auld, D. S., M. W. Farmen, S. D. Kahl, A. Kriauciunas, K. L. McKnight, C. Montrose & J. R. Weidner. 2004. Receptor Binding Assays for High Throughput Screening and Drug Discovery. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [NHI]. 129 - 178. Bethesda, MD.: NIH: National Institutes of Health and Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Bastos, V. A., F. Gomes-Neto, J. Perales, A. G. C. Neves-Ferreira & R. H. Valente (2016) Natural Inhibitors of Snake Venom Metalloendopeptidases: History and Current Challenges. *Toxins,* 8.

Bieber, A. L. 1979. Metal and Nonprotein Constituents in Snake Venoms. In: Lee CY. (editor) Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology (Continuation of Handbuch der experimentellen Pharmakologie). 295-306. Berlin, Heidelberg: Springer.

Bieth, J. G. (1995) Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition-kinetics *Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases,* 248**,** 59-84.

Bjarnason, J. B. & J. W. Fox (1988) HEMORRHAGIC TOXINS FROM SNAKE-VENOMS. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews,* 7**,** 121-209.

Borkow, G., J. M. Gutierrez & M. Ovadia (1995) ISOLATION, CHARACTERIZATION AND MODE OF NEUTRALIZATION OF A POTENT ANTIHEMORRHAGIC FACTOR FROM THE SERUM OF THE SNAKE BOTHROPS-ASPER. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects,* 1245**,** 232-238.

Brand, G. D., R. Salbo, T. J. D. Jorgensen, C. Bloch, Jr., E. B. Erba, C. V. Robinson, I. Tanjoni, A. M. Moura-da-Silva, P. Roepstorff, G. B. Domont, J. Perales, R. H. Valenteh & A. G. C. Neves-Ferreirah (2012) The interaction of the antitoxin DM43 with a snake venom metalloproteinase analyzed by mass spectrometry and surface plasmon resonance. *Journal of Mass Spectrometry,* 47**,** 567-573.

Calvete, J. J. (2013) Snake venomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon,* 75**,** 44-62.

Casewell, N. R. (2012) On the ancestral recruitment of metalloproteinases into the venom of snakes. *Toxicon,* 60**,** 449-454.

Casewell, N. R., W. Wuster, F. J. Vonk, R. A. Harrison & B. G. Fry (2013) Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution,* 28**,** 219-229.

Chippaux, J. P., V. Williams & J. White (1991) SNAKE-VENOM VARIABILITY - METHODS OF STUDY, RESULTS AND INTERPRETATION. *Toxicon,* 29**,** 1279-1303.

Christopeit, T., K. Overbo, U. H. Danielson & I. W. Nilsen (2013) Efficient Screening of Marine Extracts for Protease Inhibitors by Combining FRET Based Activity Assays and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy Based Binding Assays. *Marine Drugs,* 11**,** 4279-4293.

Cuatrecasas, P. (1970) PROTEIN PURIFICATION BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY - DERIVATIZATIONS OFAGAROSE AND POLYACRYLAMIDE BEADS. *Journal of Biological Chemistry,* 245**,** 3059-+.

Deshimaru, M., C. Tanaka, K. Fujino, N. Aoki, S. Terada, S. Hattori & M. Ohno (2005) Properties and cDNA cloning of an antihemorrhagic factor (HSF) purified from the serum of Trimeresurus flavoviridis. *Toxicon,* 46**,** 937-945.

Divers, S. J. 2006. Diagnostic Techniques. In: Douglas R. Mader, editor. Reptile Medicine and Surgery., 490-532. St. Louis, Missouri.: W.B. Saunders, Elsevier Inc. All.

Escalante, T., N. Ortiz, A. Rucavado, E. F. Sanchez, M. Richardson, J. W. Fox & J. Maria Gutierrez (2011) Role of Collagens and Perlecan in Microvascular Stability: Exploring the Mechanism of Capillary Vessel Damage by Snake Venom Metalloproteinases. *Plos One,* 6.

Eylar, E. H. & R. W. Jeanloz (1962) PERIODATE OXIDATION OF ALPHA1 ACID GLYCOPROTEIN OF HUMAN PLASMA. *Journal of Biological Chemistry,* 237**,** 1021-&.

Faça, V. M., C. S. Palma, D. Albuquerque, G. Canchaya, M. Grassi, V. L. Epifânio & E. Brandt de Oliveira. 2014. The Secretome Analysis by High-Throughput Proteomics and Multiple Reaction Monitoring (MRM). In: Daniel Martins-de-Souza, editor. Shotgun Proteomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). 323-335. New York, NY: Humana Press.

Fields, G. B. & R. L. Noble (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research,* 35**,** 161-214.

Flexner, S. & H. Noguchi (1903) The constitution of snake venom and snake sera. *Journal of Pathology and Bacteriology,* 8**,** 379-410.

Fox, J. W. & J. M. Gutierrez (2017) Understanding the Snake Venom Metalloproteinases: An Interview with Jay Fox and Jose Maria Gutierrez. *Toxins,* 9.

Fox, J. W. & S. M. T. Serrano (2005) Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon,* 45**,** 969-985.

--- (2008a) Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics,* 8**,** 909-920.

--- (2008b) Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *Febs Journal,* 275**,** 3016-3030.

---. 2010. Snake Venom Metalloproteinases. In: MACKESSY, S. P. (Ed).Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles., 95 - 114. Boca Raton, FL.: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Francischetti, I. M. B., M. E. C. Gombarovits, J. G. Valenzuela, C. R. Carlini & J. A. Guimaraes (2000) Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology,* 127**,** 23-36.

FUNASA (2001) Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. . *Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância Epidemiológica.* .

GE Health Care Life Sciences. Biacore T200 specifications: typical working ranges. https://bit.ly/2M6ZzBx. Acessado 09 de janeiro de 2019.

Georgieva, D., M. Ohler, J. Seifert, M. von Bergen, R. K. Arni, N. Genov & C. Betzel (2010) Snake Venomic of *Crotalus durissus terrificus.* Correlation with Pharmacological Activities. *Journal of Proteome Research,* 9**,** 2302-2316.

Gutiérrez, J. M., A. Rucavado & T. Escalante. 2010. Snake Venom Metalloproteinases: Biological Roles and Participation in the Pathophysiology of Envenomation. In: MACKESSY, S. P. (Ed).Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles., 115 - 138. Boca Raton, FL.: CRC Press. Taylor & Francis Group.

Herrera, C., T. Escalante, A. Rucavado, J. W. Fox & J. M. Gutierrez (2018) Metalloproteinases in disease: identification of biomarkers of tissue damage through proteomics. *Expert Review of Proteomics,* 15**,** 967-982.

Homola, J., S. S. Yee & G. Gauglitz (1999) Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B-Chemical,* 54**,** 3-15.

Huang, K. F., L. P. Chow & S. H. Chiou (1999) Isolation and characterization of a novel proteinase inhibitor from the snake serum of Taiwan habu (Trimeresurus mucrosquamatus). *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 263**,** 610-616.

Internet Archive. Coleção de eBooks e Textos acerca de venenos de serpentes. https://bit.ly/2QkBg3B. Acessado o 30 de novembro de 2018.

Kim, S., N. Gupta & P. A. Pevzner (2008) Spectral probabilities and generating functions of tandem mass spectra: A strike against decoy databases. *Journal of Proteome Research,* 7**,** 3354-3363.

Kim, S. & P. A. Pevzner (2014) MS-GF plus makes progress towards a universal database search tool for proteomics. *Nature Communications,* 5.

Koonin, E. V. & M. Y. Galperin. 2003. Evolutionary Concept in Genetics and Genomics. In: Sequence — Evolution — Function. 25-50. Boston, MA.: Springer.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4., 680–685. Nature.

Leatherbarrow, R.J. (2009) GraFit Version 7, Erithacus Software Ltd., Horley, U.K.

Liu, J. T., L. Y. Chen, M. C. Shih, Y. Chang & W. Y. Chen (2008) The investigation of recognition interaction between phenylboronate monolayer and glycated hemoglobin using surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry,* 375**,** 90-96.

Mandelbaum, F. R., M. T. Assakura, A. P. Reichl & S. M. T. M.T. Serrano. 2013. Bothropasin. In: RAWLINGS, N. D. and SALVESEN, G. (Ed). Handbook of Proteolytic Enzymes., 992-995. London, UK.: Academic Press.

Moura-da-Silva, A. M. & M. J. I. Paine. 2013. Jararhagin. In: RAWLINGS, N. D. and SALVESEN, G. (Ed). Handbook of Proteolytic Enzymes., 987-990. London, UK.: Academic Press.

Murphy, M., L. Jason-Moller & J. Bruno (2006) Using Biacore to Measure the Binding Kinetics of an Antibody-Antigen Interaction. *Current Protocols in Protein Science,* 45**,** 19.14.1-19.14.17.

Myszka, D. G. (1997) Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Current Opinion in Biotechnology,* 8**,** 50-57.

--- (1999) Improving biosensor analysis. *Journal of Molecular Recognition,* 12**,** 279-284.

Neves-Ferreira, A. G. C., N. Cardinale, S. L. G. Rocha, J. Perales & G. B. Domont (2000) Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects,* 1474**,** 309-320.

Neves-Ferreira, A. G. C., J. Perales, J. W. Fox, J. D. Shannon, D. L. Makino, R. C. Garratt & G. B. Domont (2002) Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from Didelphis marsupialis serum. *Journal of Biological Chemistry,* 277**,** 13129-13137.

Neves-Ferreira, A. G. C., R. H. Valente, G. B. Domont & J. Perales. 2017. Natural Inhibitors of Snake Venom Metallopeptidases. In: Gopalakrishnakone P., Cruz L., Luo S., editors. Toxins and Drug Discovery., 53-80. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Neves-Ferreira, A. G. C., R. H. Valente, J. Perales & G. B. Domont. 2010. Natural Inhibitors: Innate Immunity to Snake Venoms. In: Mackessy, S. P., editor. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, FL.: CRC Press. Taylor & Francis Group.

Noguchi, H. 1909. Snake venoms. An investigation of venomous snakes, with special reference to the phenomena of their venoms. Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington.

Oliveira, A. K., A. F. P. Leme, M. T. Assakura, M. C. Menezes, A. Zelanis, A. K. Tashima, M. Lopes-Ferreira, C. Lima, A. C. M. Camargo, J. W. Fox & S. M. T. Serrano (2009) Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from Bothrops jararaca venom. *Toxicon,* 53**,** 797-801.

Omori-Satoh, T. (1977) Antihemorrhagic factor as a proteinase inhibitor isolated from the serum of Trimeresurus flavoviridis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure,* 495**,** 93-98.

Omori-Satoh, T., S. Sadahiro, A. Ohsaka & R. Murata (1972) Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of Trimeresurus flavoviridis, a crotalid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure,* 285**,** 414-426.

Paine, M. J. I., H. P. Desmond, R. D. G. Theakston & J. M. Crampton (1992) PURIFICATION, CLONING, AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A HIGH-MOLECULAR-WEIGHT HEMORRHAGIC METALLOPROTEASE, JARARHAGIN, FROM BOTHROPS-JARARACA VENOM - INSIGHTS INTO THE DISINTEGRIN GENE FAMILY. *Journal of Biological Chemistry,* 267**,** 22869-22876.

Palacio, T. Z., N. A. Santos, J. C. Rosa, R. S. Ferreira, B. Barraviera & S. V. Sampaio (2017) Isolation and characterization of a novel metalloprotease inhibitor from Bothrops alternatus snake serum. *International Journal of Biological Macromolecules,* 98**,** 436-446.

Perales, J., A. G. C. Neves-Ferreira, R. H. Valente & G. B. Dornont (2005) Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon,* 45**,** 1013-1020.

Perez, J. C. & E. E. Sanchez (1999) Natural protease inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. *Toxicon,* 37**,** 703-728.

Pinho, F. M. O. & I. D. Pereira (2001) Ofidismo. *Rev Ass Med Brasil,* 47**,** 24 - 29.

Ramos, O. H. P. & H. S. Selistre-De-Araujo (2006) Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology,* 142**,** 328-346.

Rawlings, N. D., D. P. Tolle & A. J. Barrett (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal,* 378**,** 705-716.

Rawlings, N. D., M. Waller, A. J. Barrett & A. Bateman (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research,* 42**,** D503-D509.

Rhodes, D. G., R. E. Bossio & T. M. Laue (2009) DETERMINATION OF SIZE, MOLECULAR WEIGHT, AND PRESENCE OF SUBUNITS. *Guide to Protein Purification, Second Edition,* 463**,** 691-723.

Rich, R. L. & D. G. Myszka (2001) BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis. *Journal of Molecular Recognition,* 14**,** 223-228.

Sanchez, E. E. & A. Rodriguez-Acosta (2008) Inhibitors of Snake Venoms and Development of New Therapeutics. *Immunopharmacology and Immunotoxicology,* 30**,** 647-678.

Sazima, I. 1992. Natural history of the jararaca pitviper, Bothrops jararaca, in southeastern Brazil. In: J. A. Campbell; E. D. Brodie; Editors. Biology of the pitvipers., 199-216. Tyler, TX, USA.: Selva.

Segrest, J. P. & R. L. Jackson. 1972. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. In *Methods in Enzymology*, 54-63. Academic Press.

Serrano, S. M. T., A. K. Oliveira, M. C. Menezes & A. Zelanis (2014) The proteinase-rich proteome of Bothrops jararaca venom. *Toxin Reviews,* 33**,** 169-184.

Stocker, W. & W. Bode (1995) STRUCTURAL FEATURES OF A SUPERFAMILY OF ZINC-ENDOPEPTIDASES - THE METZINCINS. *Current Opinion in Structural Biology,* 5**,** 383-390.

Valente, R. H., B. Dragulev, J. Perales, J. W. Fox & G. B. Domont (2001) BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor - Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *European Journal of Biochemistry,* 268**,** 3042-3052.

Wang, X., J. Y. Xu & Y. Chen (2015) Surface Plasmon Resonance Methodology for Interaction Kinetics of Biomolecules. *Progress in Chemistry,* 27**,** 550-558.

9. ANEXOS

Certificado de aprovação comitê de ética no uso de animais da FMRP-USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Replacement|Reduction|Refinement

FMRP
65 anos USP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado *"Caracterização de proteases de venenos ofídicos e de seus inibidores sintéticos e naturais"*, registrado com o número **026/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira,** envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 30 de maio de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 20 cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) machos pesando 1.500g oriundos do Serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e 10 gambás (*Didelphis marsupialis*) machos pesando 2.000g oriundos do Bosque e Zoológico Municipal Fábio Barreto. Vigência da autorização: 30/05/2018 a 22/07/2020.

We certify that the Protocol ***nº* 026/2018,** entitled ***"Characterization of snake venom proteases and their synthetic and natural inhibitors"***, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *05/30/2018*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 20 male rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) weighing 1500g from the Serpentarium of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo and 10 male opossums (*Didelphis marsupialis*) weighing 2000g from the Municipal Zoo Fábio Barreto. This certificate is valid until 07/22/2020.

Ribeirão Preto, 30 de maio de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA–FMRP – USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil -14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315.3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br