

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

***Subclonagem e expressão do domínio catalítico da
Jararagina: Estudo do efeito das modificações pós-
traducionais na atividade hemorrágica***

LILIANA TORCOROMA GARCÍA SÁNCHEZ

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Evolução do Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Genética e Evolução, área de
concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP

LILIANA TORCOROMA GARCÍA SÁNCHEZ

*Subclonagem e expressão do domínio catalítico da
Jararagina: Estudo do efeito das modificações pós-
traducionais na atividade hemorrágica*

Orientadora: Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

SÃO CARLOS – SP
2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G216se

García Sánchez, Liliana Torcoroma.

Subclonagem e expressão do domínio catalítico da jararagina: estudo do efeito das modificações pós-traducionais na atividade hemorrágica / Liliana Torocoma García Sánchez. -- São Carlos : UFSCar, 2004.
134 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Genética experimental. 2. Veneno de serpente. 3. Clonagem. 4. Glicosilação. 5. Jararagina. 6. Metaloproteases. I. Título.

CDD: 575.10724 (20^a)

Orientadora

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

*Porque has sido mi socorro y así en la sombra
de tus alas me regocijaré.*

A Oscar, meu companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, minha orientadora e amiga, quem me abriu as portas para iniciar este projeto de vida. Agradeço seus conselhos e orientações sempre pertinentes.

À Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, pelas valiosas sugestões técnicas e por sua amizade.

À Dra. Dulce H.F. Souza pela doação da Jararagina nativa.

À Profa. Dra. Adriana K. Carmona e a Patrícia Bersanetti, do Depto. Biofísica-Escola Paulista de Medicina, da UNIFESP, pela colaboração.

À Profa. Dra. Ana Maria Moura da Silva do Instituto Butantan-SP, por providenciar o plasmídeo com o qual começou este trabalho e o anticorpo anti-jararagina.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar, especialmente a Caroline K. de Moraes e Oscar H. P. Ramos, pelo contínuo apoio e amizade.

Aos professores e pessoal administrativo do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À minha família.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ambiente do zinco nas metzincinas..	2
Figura 2. Estrutura multi-domínios de metaloproteases zinco-dependentes pertencentes à família das metzincinas.	7
Figura 3. Diagrama estéreo da a) Astacina e b) Adamalisina II.	8
Figura 4. Resumo dos múltiplos papéis da svMPs na patogênese do dano ao tecido local.	14
Figura 5. Seqüência de aminoácidos da jararagina.	23
Figura 6. Estrutura da integrina $\alpha 2\beta 1$.	25
Figura 7. Interação colágenos(s)-célula e colagenólise.	30
Figura 8. Processo de Glicosilação.	36
Figura 9. Ligação do inserto ao pCR 2.1 TOPO.	41
Figura 10. Esquema do Vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO.	42
Figura 11. Esquema do vetor de expressão pET28a.	43
Figura 12. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da região de expressão e clonagem do Vetor de expressão pET 28a.	43
Figura 13. Elementos de controle do sistema pET.	50
Figura 14. Análise de Restrição com BamHI e EcoRV do pCR 2.1 TOPO-CDJARA .	61
Figura 15. Análise de Restrição com BamHI e XhoI do vetor pET28a-CDJARA.	62
Figura 16. Análise de restrição de colônias transformantes (DE3) com pET28a – CDJARA com XhoI e BamHI.	63
Figura 17. Multialinhamento utilizando o programa NPSA MULTIALIN.	65
Figura 18. Ensaio de expressão e solubilidade. SDS-PAGE a 12% de amostras coletadas das diferentes frações dum ensaio de expressão de proteínas.	66
Figura 19. Purificação da rCDJARA em Cromatografia de Afinidade.	67
Figura 20. SDS-PAGE a 15% de amostra de rCDJARA após o envelhecimento.	69
Figura 21. Comparação do espectro de Dicroísmo Circular obtido para a rCDJARA com os espectros obtidos para a proteínas nativas ACLH e Jararagina e para a ACLH recombinante.	70
Figura 22. Imunodeteção da rCDJARA com anticorpo policlonal de coelho anti-jararagina.	71
Figura 23. Atividade Fibrinogenolítica da Jararagina Recombinante e Nativa.	72
Figura 24. Atividade proteolítica sobre fibronectina humana (HFN).	73
Figura 25. Atividade proteolítica da sobre Colágeno tipo I.	74
Figura 26. Atividade proteolítica sobre Colágeno tipo IV.	75
Figura 27. Alteração na mobilidade eletroforética da Jararagina causada pela deglicosilação.	76
Figura 28. Parâmetros cinéticos da rCDJARA.	78
Figura 29. Parâmetros cinéticos da jararagina nativa.	79
Figura 30. Parâmetros cinéticos da jararagina nativa deglicosilada.	80
Figura 31. Atividade Hemorrágica da rCDJARA.	82
Figura 32. Atividade Hemorrágica da jararagina nativa.	82

Figura 33. Atividade Hemorrágica da jararagina nativa após 24 horas de incubação.....	83
Figura 34. Atividade proteinase sobre géis de gelatina.....	83
Figura 35. Alinhamento de aminoácidos de svMPs hemorrágicas.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de reação de amplificação da região correspondente ao domínio catalítico da jararagina.	47
Tabela 2. Parâmetros cinéticos das enzimas recombinante e nativa para a hidrólise do substrato de fluorescência apagada Abz-LVEALYQ-EDDnp.....	77
Tabela 3. Composição de aminoácidos da proteína rCDJARA	85
Tabela 4. Motivos funcionais na rCDJARA. A numeração refere-se a posição do motivo na proteína, segundo o programa PROSITE.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

- α 2-M:** α 2-Macroglobulina
 α 2-PI: α 2-Inibidor de Plasmina (α 2-Plasmin Inhibitor)
A: Adenina
ACE: Enzima conversora de angiotensina (Angiotensin Converting Enzyme)
ACEI: Inibidores de ACEs (ACE inhibitors)
ACL: *Agkistrodon contortrix laticinctus*, uma serpente crotálica
ACLF: Proteína fibrinolítica não hemorrágica de ACL
ACLH: Proteína hemorrágica de ACL
ADAM: Proteína multimodular que apresenta os domínios metaloprotease e tipo desintegrina (A Disintegrin and Metalloprotease)
ADAMTS: ADAM com domínio adicional que contém repetições do tipo 1 encontrados nas trombospondinas (ADAM with Thrombospondin motifs)
Ala: Alanina
Arg: Arginina
Asn: Asparagina
Asp: Ácido aspártico
BLAST: Programa computacional que busca homologias locais entre DNAs ou proteínas (Basic Local Alignment Search Tool)
BPF: Fator Potenciador da Bradicinina
BPP: Peptídeos Potenciadores de Bradicinina
BSA: Soro Albumina Bovina
C: Citosina
CaCl₂: Cloreto de Cálcio
CDJARA: domínio catalítico da jararagina (Catalytic domain of Jararhagin)
cDNA: DNA complementar a um mRNA
Cys: Cisteína
dNTP: desoxinucleotídeo trifosfatado
D.O.: Densidade ótica
DNA: Ácido Desoxirribonucléico (Desoxiribonucleic Acid)
DTT: Ditioneitol
E.coli: *Escherichia coli*
ECM: Matriz Extracelular (Extracellular Matrix)
EDDnp: etilenodiamino-2,4-dinitrofenil (etilendiamine-2,4-dinitrophenil)
EDTA: Etilendiaminotetraacetato
EGF: Fator de Crescimento Epitelial (Epithelial Growth Factor)
G: Guanina
Gly: Glicina
Gln: Glutamina
Glu: Ácido Glutâmico
GP: Glicoproteína
Fen: Fenilalanina
His: Histidina
IL: interleucina

Ile: Isoleucina
IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB: meio de cultura para bactérias Luria Bertani
Leu: Leucina
Lis: Lisina
MEC: Matriz Extracelular
Met: Metionina
MMP: metaloproteases que digerem proteínas da ECM (Matrix Metalloproteases)
MP: Metaloprotease (Metalloprotease)
Mt-MMP: MMP ancorada a membrana plasmática (Membrane type MMP)
NaCl: Cloreto de Sódio
PA: Ativador de Plasminogênio (Plasminogen Activator)
PAI: inibidor do ativador de plasminogênio (Plasminogen Activator Inhibitor)
pb: pares de bases
PCK: proteína quinase C (Protein Kinase C)
PCR: reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
pI : ponto Isoelétrico
PLA2: Fosfolipase A2
Pro: Prolina
rCDJARA: proteína recombinante correspondente ao domínio catalítico da jararagina (recombinant Catalytic domain of Jararhagin)
S1: fração solúvel obtido após a indução da expressão da proteína heteróloga.
S2: corpos de inclusão solubilizados com uréia
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
Ser: Serina
SERPIN: Inibidor de Serinoprotease (Serine Protease Inhibitor)
svMP: Metaloprotease de veneno de serpente (snake venom Metalloprotease)
T: Timina
TACE: Enzima Conversora de TNF- α (TNF- α Converting Enzyme)
Tyr: Tirosina
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α (Tumoral Necrosis Factor- α)
t-PA: ativador tecidual de plasminogênio (tissue Plasminogen Activator)
Thr: Treonina
Trp: Triptofano
TyrK: Tirosina quinase (Tyrosine Kinase)
UAF: Unidade Arbitrária de Fluorescência
u-PA: ativador de plasminogênio tipo uroquinase (urokinase-type Plasminogen Activator)
UFC: Unidades Formadoras de Colônias
Val: Valina
vWF: Fator de von Willebrand (von Willebrand Factor)
ZnCl₂: Cloreto de Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 METALOPROTEASES.....	1
1.1.1 Patogênese do Dano Local por svMPs.....	9
1.1.2 Mecanismos da Hemorragia Causados por svMPs.....	11
1.2. COMPONENTES DO VENENO DE BOTHROPS JARARACA.....	14
1.2.1. Lectinas.....	14
1.2.2. Serinoproteases.....	16
1.2.3. Fosfolipase A2 (PLA2).....	16
1.2.4. Peptídeos Potenciadores da Bradicicina (BPPs).....	17
1.2.5. Desintegrinas.....	18
1.2.6. Metaloproteases.....	19
1.3. JARARAGINA	20
1.3.1. Estrutura Multi-Modular da Jararagina.....	21
1.3.2. A Jararagina Interfere com a Hemostasia	23
1.3.2.1. Inibidor da adesão e agregação das plaquetas <i>in vitro</i>	24
1.3.2.2. Potenciador da atividade fibrinolítica do plasma	26
1.3.2.3. Degradação de fibrinogênio pela jararagina	27
1.3.2.4. Proteólise do vWF pela jararagina	28
1.3.3 Ação Sobre Componentes da Matriz Extracelular.....	29
1.3.4 Ação Sobre Outras Células não Plaquetárias	30
1.3.5. Outras Atividades Enzimáticas	33
1.4 GLICOSILAÇÃO	35
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. MATERIAIS	40
3.1.1. cDNA e Plasmídeos	40
3.1.2. Oligonucleotídeos Iniciadores.....	44
3.1.3. Anticorpos	44
3.1.4. Animais	44
3.1.5 Outros Reagentes	45
3.1.6. Equipamentos.....	46
3.1.7. Linhagens de <i>E. coli</i>	46
3.2. MÉTODOS	47
3.2.1. Amplificação do cDNA do Domínio Catalítico da Jararagina.....	47
3.2.2. Subclonagem no Vetor de Clonagem.....	48
3.2.3. Transformação de Células Competentes.....	49
3.2.4. Seqüenciamento de DNA	50
3.2.5. Expressão	51
3.2.6. Purificação da Proteína Recombinante	52
3.2.7. Enovelamento <i>In Vitro</i>	52
3.2.8. Estimativa da Concentração Protéica.....	53
3.2.9. Eletroforese em Gel de Agarose	54
3.2.10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	54
3.2.11. Documentação de Imagens	54

3.2.12. Atividade Hemorrágica	55
3.2.13. Atividade Proteolítica Sobre Substratos Naturais	55
3.2.14. Zimografia.....	56
3.2.15. Western Blot	56
3.2.16. Parâmetros Cinéticos.....	57
3.2.17. Deglicosilação Enzimática da Jararagina Nativa	57
3.2.18. Dicroísmo Circular (CD).....	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1. RESULTADOS PRELIMINARES.....	59
4.2. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA JARARAGINA	59
4.3. SUBCLONAGEM NO VETOR DE CLONAGEM E EXPRESSÃO	60
4.4. SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO.....	61
4.5. SEQÜENCIAMENTO DO INSERTO SUBCLONADO NO VETOR DE EXPRESSÃO.....	63
4.6. ENSAIOS DE EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE.....	66
4.7. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	67
4.8. ENOVELAMENTO ATRAVÉS DE DIÁLISE	68
4.9. DICROÍSMO CIRCULAR	70
4.10. IMUNODETECÇÃO.....	71
4.11. ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA	71
4.12. ATIVIDADE SOBRE FIBRONECTINA	73
4.13. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE COLÁGENO I.....	74
4.14. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE COLÁGENO IV	75
4.15. DEGLICOSILAÇÃO ENZIMÁTICA	76
4.16. PARÂMETROS CINÉTICOS	76
4.17. ATIVIDADE HEMORRÁGICA.....	81
4.18. ZIMOGRAFIA.....	83
4.19. PARÂMETROS TEÓRICOS	84
4.19.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	84
4.19.2. MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS	85
4.19.3 MULTIALINHAMENTOS	86
5. DISCUSSÃO	88
6. CONCLUSÕES	100
7.REFERÊNCIAS.....	102

RESUMO

As metaloproteases são enzimas peptidases dependentes de zinco. Estas proteínas são ricamente encontradas em venenos de serpentes *Crotalidae* e *Viperidae*. Muitas Metaloproteases de Venenos de Serpentes (**svMPs**) são ativas sobre componentes da Matriz Extracelular (**MEC**) e este efeito pode resultar em hemorragia como consequência da degradação da membrana basal nos capilares. A Jararagina é uma **svMP** hemorrágica proveniente do veneno da *Bothrops jararaca*. Esta enzima tem atividade proteolítica sobre fibrinogênio e fibronectina e inibe a agregação plaquetária induzida pelo colágeno *in vitro*. Sua seqüência de aminoácidos corresponde a um domínio metaloprotease N-terminal, um domínio tipo desintegrina e um domínio rico em cisteína C-terminal, sendo classificada como uma metaloprotease de veneno de serpente (**svMP**) de classe *P-III*. Este trabalho descreve a expressão, purificação e re-novelamento do domínio catalítico da Jararagina. A proteína heteróloga foi produzida em *E.coli*, um sistema de expressão *in vivo*, que não faz modificações pós-traducionais. A proteína recombinante enovelada não mostrou atividade hemorrágica sobre pele de camundongo. O mesmo resultado foi obtido para a proteína nativa deglicosilada. Porém, tanto a proteína recombinante, quanto a proteína nativa, tinham sua atividade proteolítica preservada sobre fibrinogênio e fibronectina. Em conclusão, parece possível que a propriedade hemorrágica da Jararagina seja dependente de modificações pós-traducionais, enquanto que sua atividade proteolítica não dependa completamente de tais modificações.

ABSTRACT

Metalloproteases are Zn^{++} -dependent peptidase enzymes, richly found in *Crotalidae* and *Viperidae* snake venoms. Most snake venom metalloproteases (**svMPs**) are active on extracellular matrix components and this effect is thought to result in bleeding as a consequence of the basement membrane disruption in capillaries. Jararhagin is a hemorrhagic **svMP** from *Bothrops jararaca* venom. This enzyme has proteolytic activity on fibrinogen and fibronectin and inhibits collagen-induced platelet-aggregation *in vitro*. Its amino acid sequence corresponds to a N-terminal metalloprotease domain, a disintegrin-like and a C-terminal Cysteine-rich, being classified as a P-III snake venom metalloprotease (**svMP**). This work describes the expression, purification and successful refolding of the recombinant catalytic domain of jararhagin. The heterologous protein was produced in *E.coli*, an *in vivo* expression system that does not make post-translational modifications. The recombinant refolded protein did not show any hemorrhagic activity in mice skin, as well as, the native deglycosylated jararhagin. However, they preserved their proteolytic activity on fibrinogen and fibronectin. It seems that the hemorrhagic properties of these hemorrhagins are dependent on post-translational modifications, whereas their proteolytic activity is not completely dependent on such modifications.

1. INTRODUÇÃO

1.1 METALOPROTEASES

As metaloproteases (E.C. 3.4.24) são hidrolases do tipo peptidases, que dependem da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico, para a manifestação das suas atividades. As principais funções biológicas das metaloproteases são nos processos fisiológicos de angiogênese, fertilização, fusão de mioblastos, envelhecimento protéico, remodelamento tecidual, e algumas têm inferência na sinalização intracelular durante o desenvolvimento neuronal (Vu e Werb, 2000). Também tem inferência em processos patológicos como invasão de células cancerígenas e hipertensão (DeClerck, 2000; Yu e Stamenkovic, 2000), através da sua atividade proteásica, que degrada componentes da **Matriz Extracelular (MEC)**, liberando e ativando citocinas associadas à **MEC**, que modulam o crescimento do tumor, a migração e a angiogênese (McCawley e Matrisian, 2001).

Segundo Hooper (1994), de acordo com as similaridades de seqüências, as metaloproteases podem ser agrupados em quatro grupos principais:

1. *Zincinas*: possuem a seqüência **HEXXH**, como motivo de ligação ao zinco.
2. *Inverzincinas*: possuem um motivo invertido de ligação ao zinco, **HXXEH**.
3. *Carboxipeptidase*: com motivo de ligação ao zinco **HXXE**.
4. *DD-Carboxipeptidases*: com motivo de ligação ao zinco **HXH**.

As zincinas constituem o maior grupo, sendo subdividido em Gluzincinas (aquelas que tem como terceiro ligante ao zinco, um resíduo de Glu) e Metzincinas (aquelas com um resíduo de His, como terceiro ligante). As metzincinas pertencem: as astacinas, serratinas, reprotinas e matrixinas. As metzincinas possuem um motivo conhecido como Met-Turn (Figura 1), caracterizado pela presença de uma Met em uma volta da estrutura terciária, localizada C-terminalmente, em relação ao motivo de ligação ao zinco (**HEXXHXXGXXHD... M**). As reprotinas possuem um resíduo Asp, após o terceiro ligante ao zinco, formando junto com as astacinas a família conhecida como M12 (DeClerck, 2000). Formam parte desta família as **ADAMs** (**A** Desintegrina **A**nd **M**etaloproteases), as **ADAMTS** (**ADAM** with **T**hrombospondin motifs), e metaloproteases presentes em venenos de serpentes ou **svMPs** (**S**nake **V**enom **M**etalloproteinases).

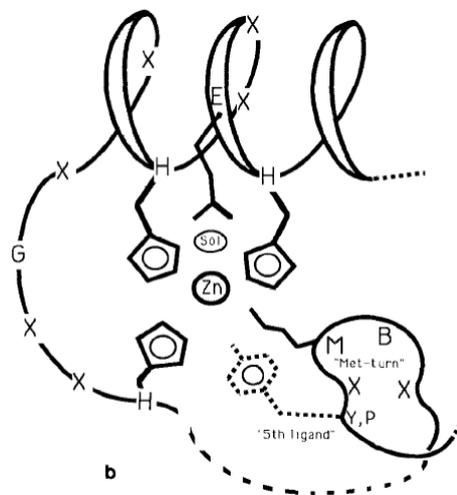


Figura 1. Representação esquemática do ambiente do zinco nas metzincinas. Estrutura idêntica (zinco e Met-turn) são mostradas por uma linha contínua, características variáveis são representadas por uma linha tracejada (Bode et al., 1993).

As **ADAMs** tem sido encontradas em ampla variedade de tecidos de diferentes organismos eucarióticos, incluindo *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, mas não em plantas nem em bactérias. Até o

momento, mais de 30 membros da família tem sido descritos (<http://www.people.virginia.edu/~jag6n/whitelab.html>). Estas proteínas, com domínios protease e de adesão celular, foram inicialmente associadas com processos reprodutivos como espermatogênese e a união e fusão do óvulo com o espermatozóide (Wolfsberg e White, 1996). Porém, nos últimos anos estas proteínas tem sido implicadas em outros processos biológicos, tais como modulação da migração celular (Alfandari *et al.*, 2001), diferenciação de osteoblastos (Inoue *et al.*, 1998), estimulação das propriedades adesivas de células tumorais (Cal *et al.*, 2000) ou ativação de vias de sinalização pela liberação de citocinas e fatores de crescimento ligados à membrana (Black *et al.*, 1997). Exemplo desta última função é constituído pela **TACE** (TNF- α converting enzyme) ou **ADAM-17**, envolvida na liberação da citocina **TNF- α** (Tumor Necrosis Factor- α) da membrana celular (Black *et al.*, 1997); a **ADAM-9/MDC9** é responsável pelo processamento do ectodomínio do fator de crescimento tipo **EGF** ligado a heparina, ancorado na membrana; **ADAM 10** tem um papel importante durante a neurogênese em *Drosophila* e parece estar envolvida também no processo de orientação do axônio (Fambrough *et al.*, 1996; Hattori *et al.*, 2000).

As **ADAMTS** são proteínas relacionadas com as **ADAMs**, que adicionalmente, contem várias repetições tipo trombospondina na região C-terminal, mas, que carecem do domínio transmembrana presente nas **ADAMs** (Kuno *et al.*, 1997). Até o momento, 11 diferentes **ADAMTS** tem sido identificadas em tecidos humanos (Cal *et al.*, 2002), e em alguns casos seu papel funcional em processos normais e patológicos tem sido descrito. A **ADAMTS-1/METH-1** e a **ADAMTS-8/METH-2** tem atividade angio-inibitória (Vazquez *et al.*, 1999). A **ADAMTS-2** e a

ADAMTS-3 são pro-colágeno N-peptidases (Fernandes *et al.*, 2001) e a deficiência de **ADAMTS-2** causa a Síndrome de Ehlers-Danlos VIIC em humanos (Colige *et al.*, 1999). A **ADAMTS-4** e a **ADAMTS-5/11** são agrecanases envolvidas na degradação do agrecan cartilaginoso na doença artrítica (Tortorella *et al.*, 1999; Abbaszade *et al.*, 1999).

As matrixinas ou **MMPs** ou Metaloproteases de Matriz (Woessner, 1994), consistem em collagenases, gelatinases e estromelisinases, que podem ser encontradas na forma solúvel ou ancoradas na membrana celular como as **MT-MMP** (Membrane type **MMP**). As **MMPs** possuem um importante papel no remodelamento da matriz extracelular (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Estas enzimas são expressas em níveis baixos no tecido adulto normal, mas, em processos de remodelamento normal e patológico (desenvolvimento embrionário, reparo de tecidos, inflamação, invasão tumoral e metástase), sua expressão encontra-se elevada. A **MMP-2** (gelatinase A) e a **MMP-9** (gelatinase B) degradam seletivamente o colágeno tipo IV e a gelatina. Incremento nos níveis de **MMP-2** tem sido associado com invasão e metástase em vários tipos de tumores (Koshiba *et al.*, 1998). A ativação do zimogênio **pro-MMP-2** é efetuado pelas **MT-MMPs** (Murphy *et al.*, 1999). As **MT-MMPs** são diferentes das outras **MMPs**, somente, em que contém uma seqüência que atravessa a membrana na quarta e última repetição tipo pexina do domínio carboxi-terminal.

As **svMPs** (snake venom Metalloproteases) são componentes dos venenos de serpentes, relacionados com a degradação proteolítica de componentes da MEC, da membrana basal endotelial e de alguns receptores de membrana plasmática, que interferem com a hemostasia, atuando como substâncias

anticoagulantes, fibrinolíticas, inibidores ou ativadores plaquetários, entre outros. O efeito proteolítico sobre componentes da MEC de muitas **svMPs** pode resultar em hemorragia como consequência da degradação da membrana basal nos capilares. As **svMPs** que possuem atividade hemorrágica são chamadas de hemorraginas.

Bjarnason & Fox, 1994 classificaram as **svMPs** de acordo com a massa molecular e sua atividade hemorrágica, da seguinte forma:

- *Classe I ou P-I*: esta classe inclui **svMPs** pequenas com massas moleculares em torno de 24 kDa, e com pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. Tem um domínio catalítico altamente conservado. Sofrem um processamento inicial para passar da forma de zimogênio à forma ativa, através da clivagem do pró-domínio ao nível do N-terminal do domínio metaloprotease. Este grupo de toxinas se subdivide em dois grupos:
 - *Classe P-IA*: toxinas da classe *P-I* com seqüências de aminoácidos semelhantes e com pontos isoelétricos fracamente ácidos. A HT-e, do veneno de *Crotalus atrox* (Bjarnason e Tu, 1978), pertence a este grupo.
 - *Classe P-IB*: Pertencem a este grupo toxinas da classe *P-I* fracamente hemorrágicas. Um exemplo desta classe de proteínas é representado pela toxina HT-d, do veneno de *Crotalus atrox* (Bjarnason e Tu, 1978).
- *Classe II ou P-II*: pertencem a esta classe as **svMPs** médias, caracterizadas por apresentarem, além do domínio metaloprotease, um domínio desintegrina contendo a seqüência RGD. Sofrem um processamento adicional ao inicial das *P-I*, para gerar peptídeos desintegrina. Esta classe de toxinas é

representada no veneno principalmente por seu produto processado proteoliticamente, as desintegrinas (Chen *et al.*, 2003). Um representante deste grupo de proteínas é a Jerdonitina, uma toxina do veneno de *Trimeresurus jerdonii* (Chen *et al.*, 2003).

- *Classe III ou P-III*: incluem grandes hemorraginas com massas moleculares entre 55 kDa e 90 kDa, que são as mais potentes toxinas hemorrágicas. Estas proteínas possuem além do domínio catalítico, um domínio desintegrina e um domínio rico em cisteína. No veneno são representadas predominantemente na forma de três domínios sem processamento proteolítico adicional ao inicial (Moura-da-Silva *et al.*, 2003). Uma das *P-III* mais estudadas é a Jararagina isolada do veneno de *Bothrops jararaca* (Paine *et al.*, 1992).
- *Classe IV ou P-IV*: representadas por grandes **svMPs** de massa molecular de aproximadamente 95 kDa, com baixa atividade hemorrágica. Apresentam, além dos três domínios das *P-III* já descritos, um domínio adicional tipo lectina ligado por uma ponte dissulfeto à cadeia polipeptídica. Um exemplo deste grupo de proteínas é a proteína LHF-I do veneno de *Lachesis muta muta* (Sánchez *et al.*, 1987).

A Figura 2 ilustra um esquema comparativo da estrutura multi-domínios das **svMPs** com outras **MPs** zinco dependentes da família das Metzincinas. Estudos de comparação da seqüência de aminoácidos das **svMPs** indicam, que apesar das diferenças nos seus tamanhos moleculares, todas estas enzimas podem estar relacionadas através de um gene ancestral comum (Hite *et al.*, 1994; Paine *et al.*, 1992).

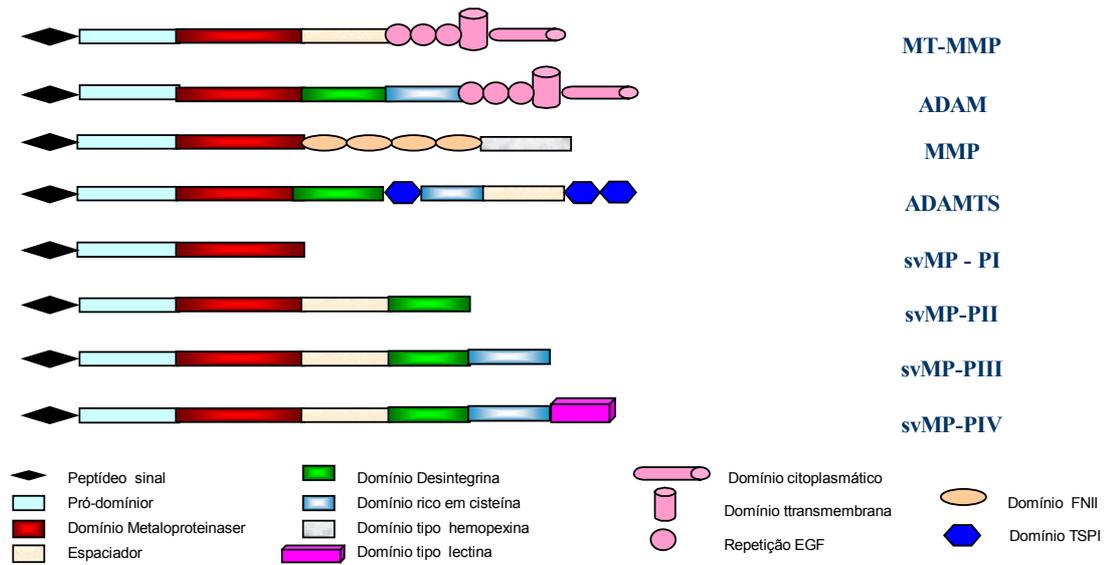


Figura 2. Estrutura multi-dominios de metaloproteases zinco-dependentes pertencentes à família das metzincinas (Tang, 2000; Okuda et al., 2002).

Estudos de cristalografia das **svMPs** Adamalisina II, Atrolisina C, H₂-Proteinase e Acutolisina A, revelam estruturas semelhantes, sendo moléculas elipsoidais, com uma fenda no sitio ativo (Figura 3), que separa um pequeno subdomínio do corpo principal da proteína (Gomis-Ruth *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994; Kumasaka *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 1997). A atividade hemorrágica destas proteínas tem sido associada com sua atividade proteolítica, já que, a quelação do íon de zinco abole ambos os efeitos, o proteolítico e o hemorrágico (Bjarnason e Fox, 1994; Bjarnason e Tu, 1978).

domínio **MP** (*P-I*) (Bjarnason e Fox, 1994; Hite *et al.*, 1994) ou contendo só os domínios desintegrina/rico em cisteína (Jia *et al.*, 1996; Moura da silva *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem que, o domínio **MP** tem um importante papel na inibição plaquetária, talvez, por hidrólise das integrinas plaquetárias, como demonstrado para a Jararagina (Kamiguti *et al.*, 1996^b). Estudos com **svMPs** recombinantes de *Agkistrodon halys* mostram que o domínio tipo desintegrina modula a especificidade catalítica das enzimas sobre substratos da **MEC** (Jeon e Kim, 1999)

Uma vez que as **svMPs P-III** possuem domínios tipo desintegrina/rico em cisteína, acredita-se que algumas desintegrinas possam originar-se por autoproteólise destas enzimas (Takeya *et al.*, 1993). Isso é reforçado pelos achados de Usami *et al.*, (1994) e Moura-da-Silva *et al.*, (2003) que determinaram que o componente do veneno de *B. jararaca*, a Jararagina C, é gerado pela autólise da Jararagina.

1.1.1 Patogênese do Dano Local por svMPs

As manifestações do envenenamento por serpentes viperídeas ou crotalídeas podem ser locais ou sistêmicas. Efeitos locais freqüentemente incluem dor, inchaço, equimose e hemorragia local e em alguns casos necrose na área da picada, que resulta geralmente em uma seqüela permanente (Gutierrez *et al.*, 1989). Efeitos sistêmicos incluem alterações na coagulação sanguínea ou coagulopatia e vários tipos de hemorragia distantes do sitio da mordida, tais como, hemorragia gengival, púrpura, macrohematúria, epistaxe, sangramento uterino e hemoptise.

Venenos viperídeos e crotalídeos possuem componentes que podem afetar a hemostasia por causar mudanças na coagulação sanguínea e a função plaquetária (Hutton e Warrel, 1993; Kamiguti e Sano Martins, 1995). Muitas destas toxinas,

carecem de atividade coagulante, mas possuem a habilidade de causar hemorragia local. Este grupo consiste quase inteiramente de metaloproteases (**svMPs**) contendo zinco (Bjarnason e Fox, 1994).

As **svMPs** são responsáveis pelo efeito hemorrágico característico de envenenamentos por serpentes crotalídeas e viperídeas (Bjarnason e Fox, 1994; Kamiguti *et al.*, 1998; Hati *et al.*, 1999). Além disso, tem-se evidenciado que estas enzimas também estão envolvidas na patogênese da mionecrose local (Gutierrez *et al.*, 1995^b), dano da pele (Rucavado *et al.* 1998), edema e outras reações associadas com a inflamação (Gutierrez *et al.*, 1995^a; Moura-da-Silva *et al.*, 1996). Por tudo isso, as **svMPs** têm um relevante papel na patogênese do dano local induzido pelo veneno e constituem alvo importante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

A injeção intramuscular de muitas **svMPs** hemorrágicas resulta em dano agudo às células musculares, como a mionecrose (Gutierrez *et al.*, 1995^b; Ownby, 1990; Rucavado *et al.*, 1995). No entanto, Gutierrez *et al.*, (1995^b), pesquisando a ação da **svMP** hemorrágica BaH1 do veneno de *B. asper*, sugeriu que o dano muscular é secundário à isquemia que acontece no músculo esquelético como consequência da hemorragia.

As **svMPs** também afetam drasticamente a regeneração do músculo esquelético, por afetar os microvasos, ocasionando uma pobre e incompleta resposta regenerativa (Arce *et al.*, 1991).

svMPs induzem hemorragia, mionecrose e bolhas, tendo um papel relevante na resposta inflamatória complexa e multifatorial característica do envenenamento por mordida de serpentes. Estas enzimas induzem edema (Gutierrez

et al., 1995^a) e liberação de citocinas inflamatórias, quando injetadas no músculo e incubadas com macrófagos *in vitro*. A Jararagina libera **TNF- α** a partir de seu precursor na membrana, sugerindo que as **svMPs** podem mediar a ativação de uma variedade de mediadores inflamatórios da membrana celular (Moura-da-Silva *et al.*, 1996). Este resultado, associado com a característica de que **svMPs** também podem ativar **MMPs** endógenas por clivagem do seu pró-peptídeo, indica que, estas enzimas contribuem na degradação da **MEC** e a inflamação induzida pelo veneno. Um conspícuo incremento na expressão de várias **MMPs** foi observada no tecido muscular e pele após a injeção da **svMP** de *Bothrops asper*, a BaP1 (Rucavado *et al.*, 1998).

1.1.2 Mecanismos da Hemorragia Causados por svMPs

Metaloproteases de venenos viperídeos e crotalídeos produzem sangramento local por causar lesões nas paredes dos pequenos vasos sanguíneos (Ohsaka, 1979; Ownby, 1990) devido à proteólise de componentes da membrana basal (Ohsaka, 1979; Bjarnason e Tu, 1978; Bjarnason *et al.*, 1988). Tem-se demonstrado que estas enzimas degradam as principais proteínas da Matriz Extracelular (Bjarnason *et al.*, 1988; Baramova *et al.*, 1990), danificando a integridade dos vasos sanguíneos, o que explica a hemorragia local.

Existem dois mecanismos pelos quais, eritrócitos e componentes do sangue, escapam para os tecidos induzidos pela ação das **MPs** hemorrágicas. Primeiro, a hemorragia '*per diapadese*', através das separações das junções entre as células endoteliais; e segundo, a hemorragia '*per rhexis*', através dos poros formados no interior das células endoteliais danificadas. A hemorragia induzida por **svMPs** é

principalmente por mecanismo ‘*per rhexis*’ em vasos sanguíneos capilares (Ownby, 1990; Lomonte *et al.*, 1994). Em vênulas tem-se observado hemorragia ‘*per diapedese*’ induzida por **svMPs**. Uma explicação deste fenômeno é que as vênulas são muito mais reativas do que os capilares à ação de mediadores inflamatórios, o que incrementa a permeabilidade capilar devido à alta densidade de receptores para tais agonistas (Collins, 1999). Como consequência, sugeriu-se que a inflamação local induzida por **svMPs**, com liberação de mediadores inflamatórios, pode induzir contração das células endoteliais venulares, ampliando as junções intercelulares com escape de plasma e eritrócitos (Gutierrez e Rucavado, 2000).

As **svMPs** também são proteoliticamente ativas sobre componentes da membrana basal, tais como, laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e nidogênio, *in vitro* (Rucavado *et al.*, 1999; Bjarnason *et al.*, 1988; Baramova *et al.*, 1991; Maruyama *et al.*, 1992) e *in vivo* (Ownby *et al.*, 1978; Moreira *et al.*, 1994), implicando que a hemorragia induzida por venenos de serpentes é uma consequência da degradação proteolítica da membrana basal (Gutierrez e Rucavado, 2000). Por outro lado **svMPs** não hemorrágicas e **MMPs**, que participam na inflamação e remodelamento do tecido, degradam os componentes da membrana basal (Shapiro, 1998), mas, não necessariamente induzem hemorragia. É provável que **svMPs** hemorrágicas clivem seletivamente ligações peptídicas nas proteínas da membrana basal, ocasionando a hemorragia como consequência da clivagem destas ligações-chaves, sem causar, necessariamente, a degradação de toda a proteína e constituintes proteoglicanas (Gutierrez e Rucavado, 2000). *In vitro*, as **svMPs** produzem desadesão das células do seu substrato, o que não indica, necessariamente, a perda da sua viabilidade. Porém, *in vivo*, células endoteliais tratadas com estes compostos,

apresentam diferenças nas suas características morfológicas e funcionais, como consequência de fatores hemodinâmicos nos microvasos (Ballerman *et al.*, 1998; Topper e Gimbrone, 1999). Depois da hidrólise dos componentes da membrana basal por **svMPs**, estes fatores biofísicos podem mediar a inclusão de alterações funcionais e morfológicas nas células endoteliais (Hati *et al.*, 1999; Rucavado *et al.*, 1995), caracterizadas por vesiculação, com conseqüente aparição de poros que levam a extravasação (Moreira *et al.*, 1994). Em conclusão, o dano das células endoteliais por **svMPs** hemorrágicas, é resultado de eventos complexos, nos quais forças hemodinâmicas tem um papel importante, associado a clivagem das ligações peptídicas chaves nas proteínas da membrana basal.

A apoptose pode não ter nenhum papel na patogênese da hemorragia aguda induzida pelo veneno, mas, pode participar de outros aspectos do dano endotelial em envenenamento por serpentes (Gutierrez e Rucavado, 2000).

Na figura 4, se resume esquematicamente os múltiplos papeis das **svMPs** na patogênese do dano ao tecido local.

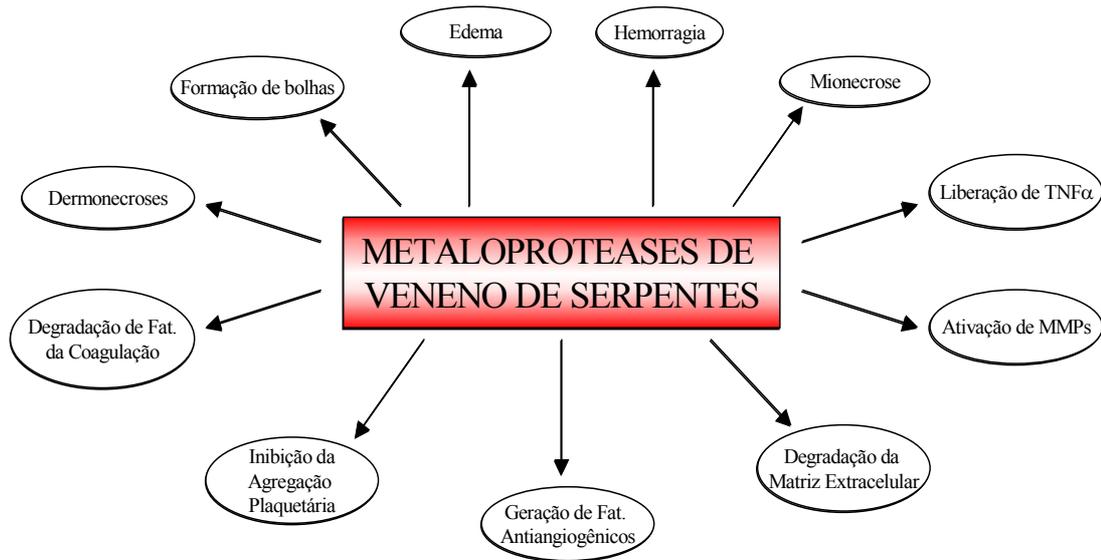


Figura 4. Múltiplos papéis das svMPs na patogênese do dano ao tecido local. Alguns efeitos são devidos à ação direta destas proteínas, e outros são causados pela ação indireta. Inibição da agregação plaquetária e degradação dos fatores da coagulação sanguínea, contribuem às alterações sistêmicas, mas também, à lesão local, provavelmente por potencializar o efeito hemorrágico, resultante da ação das Metaloproteases na microvasculatura local (Gutierrez e Rucavado, 2000).

1.2. COMPONENTES DO VENENO DE BOTHROPS

JARARACA

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são misturas bastante complexas de toxinas com diferentes propriedades tóxicas ou enzimáticas. Os principais componentes encontrados no veneno de *Bothrops jararaca* são: lectinas, metaloproteases, serinoproteinasas, desintegrinas, fosfolipases e os peptídeos que agem sobre a bradicinina e o sistema angiotensina.

1.2.1. Lectinas: Pertencem à família das lectinas tipo C, que interagem com proteínas plasmáticas, componentes da cascata de coagulação ou com as plaquetas (Brinkhous *et al.*, 1981; Ozeki *et al.*, 1994; Fujimura *et al.*, 1995; Kawasaki *et al.*,

1996; Matsushita *et al.*, 2000; Monteiro e Zingali, 2000). Entre as lectinas do veneno de *B. jararaca* se encontram:

- **Botroacetina:** Proteína de 31 kDa que promove a aglutinação plaquetária por formação de um complexo solúvel com o Fator de von Willebrand (vWF), ativando o seu domínio A1, favorecendo sua interação com a GP Ib plaquetária (Brinkhous *et al.*, 1981; Matsushita *et al.*, 2000; Read *et al.*, 1989).
- **Jararaca GPIb-BP:** Proteína de 30 kDa que não induz a agregação plaquetária. Liga-se à GPIb, inibindo sua interação com o vWF (Fujimura *et al.*, 1995; Kawasaki *et al.*, 1996).
- **Botrojaracina:** De 27 kDa, possui um efeito anticoagulante resultante de dois mecanismos sinérgicos e distintos (Monteiro e Zingali, 2000):
 - *Formação de um complexo com a Trombina:* inibindo-a para agir sobre substratos como o fibrinogênio, o receptor de plaquetas, a proteína C e o Fator V, atuando como um potente inibidor seletivo de agregação plaquetária induzida pela trombina (Fenton *et al.*, 1998).
 - *Formação de um complexo com a Pró-trombina:* Reduzindo a formação de α -trombina, o que permite que esta toxina atue como um eficiente anticoagulante após a ativação da via intrínseca da coagulação sanguínea.
- **Lecitina homodimérica:** Lectina ainda não nomeada que causa hemaglutinação cálcio dependente e não possui efeito sobre a aglutinação das plaquetas (Ozeki *et al.*, 1994).

- **Jararaca GP IX/X:** heterodímero ligado por pontes dissulfeto, que liga aos fatores da coagulação IX e X e a proteína S, de maneira cálcio-dependente, interferindo com a coagulação (Sekiya *et al.*, 1993).

1.2.2. Serinoproteases: São serinoproteases com atividade tipo trombina (Kamiguti e Sano-Martins, 1995). Entre as principais serinoproteases presentes no veneno de *B.jararaca* encontram-se:

- **Botrombina:** (33 kDa), coagula o fibrinogênio e não possui nenhum efeito sobre as plaquetas, a menos que o fibrinogênio exógeno esteja presente (Nishida *et al.*, 1994).
- **PA-BJ** (30 kDa) Possui atividade amidolítica e induz agregação plaquetária (Serrano *et al.*, 1995) por interagir com o receptor plaquetário **PAR-1** (**P**rotease **A**ctivated **R**eceptor-1) (Santos *et al.*, 2000).
- **KN-BJ 1 e KN-BJ 2:** com atividade amidolítica, atividade sobre a liberação de cininas e atividade coagulante (Serrano *et al.*, 1998).

1.2.3 Fosfolipase A2 (PLA 2): São enzimas lipolíticas que clivam a ligação Sn-2 acil dos fosfolípidos da membrana, produzindo lisofosfatídeos e ácidos graxos livres (principalmente ácido araquidônico), mediadores pró-inflamatórios como **PAF** (**F**ator **A**tivador de **P**laquetas) e os eicosanóides (Dennis, 1978; Chang *et al.*, 1987). O veneno de *B.jararaca* apresenta uma baixa atividade fosfolipásica quando comparado ao veneno de *B.moojeni*, *B.jararacussu*, *B.neuwiedi* e *B.pradoi* (Moura-da-Silva, 1991), porém, uma fração com atividade

fosfolipásica, que inibe a agregação plaquetária, foi descrita por Zingali *et al.*, (1990). Entre as fosfolipases do veneno de *B.jararaca* encontram-se:

- **BJ-PLA2**: Fator inibidor da agregação plaquetária (Serrano *et al.*, 1999), com 124 aa.
- **JAR 10, 11, 12 e 13**: Isoladas por Moura-da-Silva *et al.*, (1991). Têm peso molecular de aproximadamente 15 kDa, com diferentes atividades fosfolipásica e miotóxica, sendo que as frações denominadas como JAR 11 e 12 as que apresentam maior atividade fosfolipásica, enquanto que a JAR 12 e 13 apresentam maior atividade miotóxica.

1.2.4. Peptídeos Potenciadores da Bradicinina (BPPs): São inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ACE), com consequente efeito anti-hipertensivo. Um dos primeiros **BPPs** identificados no veneno foi o **BPF** (Fator Potenciador da Bradicinina), por Ferreira e Rocha e Silva (1965), que deu origem ao Captopril (Orning *et al.*, 1991), um medicamento mundialmente utilizado no tratamento da hipertensão. Até o momento foram descritos treze **BPPs** no veneno de *B.jararaca* (Cintra *et al.*, 1990).

1.2.5. Desintegrinas: Proteínas que são sintetizadas na glândula venenífera como proteína multidomínio contendo os domínios metaloprotease, desintegrina e rico em cisteína, que posteriormente são processadas proteoliticamente no seu extremo amino terminal (Dennis *et al.*, 1990; Takeya *et al.*, 1993). Estas proteínas são ricas em pontes dissulfeto e usualmente possuem no seu sítio ativo a seqüência

RGD, essencial para sua capacidade de bloquear a interação de integrinas com seus ligantes (Scarborough *et al.*, 1993). As desintegrinas se ligam através desta seqüência RGD ás integrinas (Gould *et al.*, 1990). A localização das pontes disulfeto e a seqüência RGD é invariável em todas as desintegrinas descritas até o momento, e não existem grupos sulfidrila livres nas desintegrinas, já que todos estão envolvidos na formação de pontes disulfeto (Calvete *et al.*, 1997). Existem, pelo menos, duas classes de desintegrinas: 1) As pequenas (5 a 9 kDa), derivadas das **svMPs** da classe *P-II*. A maioria dos membros desta classe possuem a seqüência RGD em sua estrutura (desintegrinas RGD). 2) As desintegrinas maiores (~30 kDa), em que a seqüência RGD esta ausente (desintegrinas-*like*). Estas proteínas são derivadas das *P-III*.

As desintegrinas ocorrem nas formas monoméricas e diméricas. Varias desintegrinas monoméricas já foram descritas, dentre elas a flavoviridina, a echistatina, a eristostatina, entre outras, todas elas potentes inibidores da agregação plaquetária (Gould *et al.*, 1990). As proteínas diméricas são pouco conhecidas, más recentemente Marcinkiewicz *et al.*, (1999^a) descreveu a EC3 (proteína heterodimérica do veneno de *Echis carinatus suchoreki*). Em outro trabalho, Marcinkiewicz *et al.*, (1999^b) identificaram a desintegrina heterodimérica EMF10, isolada do veneno de *Eristocophis macmahoni*. No nosso laboratório foi isolada a desintegrina homodimérica BaG do veneno de *Bothrops alternatus* (Cominetti *et al.*, 2003).

Entre as principais desintegrinas encontradas no veneno de *B.jararaca*, encontra-se:

- **Jararagina C:** Produto proteolítico da Jararagina, que corresponde ao seu domínio tipo desintegrina (com seqüência ECD ao invés da RGD das desintegrinas verdadeiras) e o domínio rico em cisteína. Esta desintegrina tem uma massa molecular de 28 kDa e inibe a agregação plaquetária induzida pelo colágeno e pelo ADP (Usami *et al.*, 1994).
- **Jaracetina:** Dímero de 60 kDa que constitui uma forma diferencialmente processada da Jararagina. Interage com o domínio A do vWF e também bloqueia a adesão das plaquetas ao colágeno dependente da integrina $\alpha 2\beta 1$ (Luca *et al.*, 1995).
- **Jaracina:** Desintegrina RGD inibidora da agregação plaquetária (Scarborough *et al.*, 1993).
- **Jarastatina:** Desintegrina RGD que liga receptores de neutrófilos, promovendo atividade celular e a alteração dinâmica dos filamentos de actina (Coelho *et al.*, 1999).

1.2.6. Metaloproteases: Responsável pelo efeito hemorrágico característico destes envenenamentos (Bjarnason e Fox, 1994). As principais metaloproteases já identificadas no veneno de *B.jararaca* são:

- **Fatores Hemorrágicos HF 2 e HF 3:** com massa molecular de 49.1 kDa (HF2) e 62 kDa (HF3) (Assakura *et al.*, 1986).
- **Jararafibrase I, II, III, IV:** com atividade hemorrágica e fibrinolítica (Maruyama *et al.*, 1993).
- **Botropasina:** (48 kDa) Fraca atividade hemorrágica (Mandelbaun e Assakura, 1988).

- **Proteinase J:** Metaloprotease dependente de zinco que não apresenta atividade hemorrágica (Tanizaki *et al.*, 1989).
- **Jararagina:** Uma metaloprotease/desintegrina com massa molecular de 52 kDa, com ação hemorrágica (Paine *et al.*, 1992).

1.3. JARARAGINA

O envenenamento por *Bothrops jararaca* constitui o principal problema deste tipo no sudeste do Brasil, sendo a hemorragia local e sistêmica uma das maiores conseqüências do envenenamento por esta espécie (Rosenfeld, 1971; Cardoso *et al.*, 1993). O principal componente do veneno responsável por este efeito se pensa que seja a Jararagina, a qual, causa intensa hemorragia local inibindo a agregação plaquetária *in vitro* e também contribui no desenvolvimento da hemorragia sistêmica *in vivo* (Kamiguti *et al.*, 1991). Esta enzima não é inibida por inibidores de proteinases plasmáticas, incluindo a α 2-macroglobulina (Kamiguti *et al.*, 1996^b).

A Jararagina (E.C. 3.4.24.73), é uma hemorragina que inibe a agregação plaquetária por bloqueio da ligação do colágeno à integrina plaquetária α 2 β 1. Esta enzima é uma zinco-metaloprotease hemorrágica de alta massa molecular (47 kDa), da classe *P-III*, com 421 aminoácidos, na proteína madura após a modificação pós-traducional (Paine *et al.*, 1992). Pertence à família metaloprotease, e à subfamília reprotisina, com atividade catalítica hidrolase do tipo endopeptidase dependente do zinco (Bjarnason & Fox, 1994). O cDNA que codifica a Jararagina foi clonado e seqüenciado por Paine *et al.*, (1992). Esta enzima tem uma seqüência conservada

ECD no seu domínio tipo desintegrina, próximo à região aonde é encontrada a seqüência RGD, das verdadeiras desintegrinas.

A Jararagina pode interferir com a função plaquetária em duas formas, por degradação dos diferentes receptores plaquetários e proteínas adesivas envolvidas na hemostasia; e por interferência não enzimática (mediada pelo domínio desintegrina) com a função de receptores da adesão plaquetária (Kamiguti *et al.*, 1996^b).

Moura da Silva *et al.*, (2003), determinaram que formas alternativas de Jararagina são secretadas pela glândula venenífera. Uma das formas é proteoliticamente estável (que se apresenta no veneno na forma da Jararagina) e outra, proteoliticamente instável, que é processada rapidamente no veneno produzindo a Jararagina C. Uma terceira forma é refratária à proteólise *in vivo* e autólise *in vitro*. Estes autores demonstraram também, que o processamento das svMPs *P-III* é variável, o que é consistente com variações intra-espécies de metaloproteases observadas em venenos de diferentes espécimes de *B. jararaca*.

1.3.1. Estrutura Multi-Modular da Jararagina

Segundo Paine *et al.*, (1992) a Jararagina tem uma estrutura multidomínios, como representada na Figura 5. Estes domínios são:

- ***Peptídeo sinal***: este peptídeo tem como função dirigir a proteína para sua localização subcelular ou secreção (Shah *et al.*, 2000).
- ***Pro-domínio***: Consiste em uma região com resíduos de aminoácidos altamente conservados, que regula a atividade enzimática através da interação entre a sulfidril do resíduo Cys, do motivo PKMCGVTQ das svMPs, com o

zincu presente no sitio ativo. Esta interação resulta na inativação do domínio catalítico, um mecanismo chamado “Cysteine Switch”, similar ao proposto para as **MMPs** e encontra-se no precursor protéico não processado. Esta região permite que às metaloproteases sejam armazenadas na forma de zimogênios inativos para evitar sua autodigestão. (Grams *et al.*, 1993).

- **Domínio central catalítico:** é constantemente esférico ou dipsóide, e partido pela fenda de ligação de substrato. Ao fundo dessa fenda encontra-se o zinco, que se liga ao domínio metaloprotease através do motivo conservado **HEXXHXXGXXHD...M**, e perto deste, a seqüência consenso **CIMXP** (DeClerck, 2000). Peptídeos cíclicos com o motivo RKK baseados na seqüência deste domínio ligam fortemente ao domínio $\alpha 2I$ da integrina $\alpha 2\beta 1$, sendo um potente inibidor de sua interação com colágeno tipo I e IV e laminina-1 (Ivaska *et al.*, 1999).
- **Domínio tipo desintegrina:** com a seqüência ECD substituindo a seqüência RGD típica das desintegrinas (Bjarnason & Fox, 1994), está associado com a especificidade das **svMPs** por integrinas (Zhou *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 2000).
- **Domínio C-terminal rico em cisteínas:** com alta densidade de resíduos de cisteína, sendo relacionado com a inibição da agregação plaquetária, induzida por colágeno (Jia *et al.*, 2000). Peptídeos baseados na seqüência deste domínio inibem a interação de plaquetas e células $\alpha 2\beta 1$ -K562 ao colágeno, confirmando o papel deste domínio na interação de *P-III svMPs* com a função da integrina $\alpha 2\beta 1$ (Kamiguti *et al.*, 2003).

ATRPKGAVQPKYEDAMQYEFKVNGEPPVVLHLEKNKGLFSKDYSEIHYS PDGREITTTYPPVEDHCYYHG
 RIENDADSTASISACNGLKGYFKLQRETYFIEPLKLPDSEAHAVFKYENVEKEDEAPKMCVGTQNWKS
 YEPISKASQLAFTA EQQRYDPYKYIEFFVVVDQGVTKNNGDLDKIKARMYELANIVNEIFRYLYMHVA
 LVGLEIWSNGDKITVKPDVDYTLNSFAEWRKTDLLTRKKHDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSMCHPK
 RSVGIVQDYSPINL VVAVIMAHEGHNLGIHHD TGSCSCGDYPCIMGPTISNEPSKFFSNCSYIQCWDF
 IMNHNPECIINEPLGTDIISPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSQCQGHGDCCE
 QCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHK NGQPCLDNYGYCYNGNCPIMYHQCYALFGA
 DVYEAEDSCFKDNQKGNYYGYCRKENGKKIPCAPEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCMFYSNDDEHKGMV
 LPGTKCADGKVC SNGHCVDVATAY



Figura 5. Seqüência de aminoácidos da jararagina (Paine *et al.*, 1992).

1.3.2. A Jararagina Interfere com a Hemostasia

A Jararagina contribui à hemorragia sistêmica do envenenamento porque não é inibida efetivamente pelos inibidores de proteinase plasmáticos como a α 2-macroglobulina (Kamiguti *et al.*, 1994); e porque degrada proteoliticamente o receptor plaquetário de colágeno, a integrina α 2 β 1 (Kamiguti, *et al.*, 1995^a), e o ligante adesivo, o **vWF** (Kamiguti *et al.*, 1995^b). A atividade colagenase desta proteína é excluída como mecanismo de inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno, já que, esta enzima degrada seletivamente colágeno tipo IV não fibrilar (Maruyama *et al.*, 1992), o qual não é usado em estudos de agregação plaquetária (Kamiguti *et al.*, 1996^b).

Os principais receptores plaquetários para ligantes macromoleculares envolvidos na adesão e agregação são: a GP Ib (receptor de trombina e de **vWF**), a integrina α I**II** β 3 (receptor de fibrinogênio e de vários outros ligantes contendo a seqüência RGD), a integrina α 2 β 1 (receptor de colágeno, Figura 6) e a GP IV (receptor de trombospondina). Em plaquetas tratadas com Jararagina nenhuma

alteração da GPIb, nem da GP IV foi detectada (Kamiguti *et al.*, 1995^a). A integrina α IIb β 3 liga ao fibrinogênio secundariamente à ativação da integrina plaquetária α 2 β 1. A α IIb β 3 também permanece estrutural e funcionalmente inalterada em plaquetas tratadas com Jararagina (Kamiguti *et al.*, 1995^a), permitindo que a agregação plaquetária dependente de colágeno, mediada por esta integrina, permaneça preservada. Em contraste, a expressão da integrina α 2 β 1 em plaquetas tratadas com Jararagina, foi marcadamente reduzida. Isto explica a resposta alterada das plaquetas ao colágeno e sustenta o papel vital desta integrina na interação plaquetas–colágeno (Kamiguti *et al.*, 1996^b). A deficiência congênita deste receptor tem manifestações hemorrágicas (Nieuwenhuis *et al.*, 1985).

1.3.2.1. Inibidor da adesão e agregação das plaquetas *in vitro*

A adesão das plaquetas aos vasos sanguíneos danificados envolve a adesão de glicoproteínas (GP) da membrana plaquetária, a componentes da MEC, tais como: a união do complexo GPIb/IX ao vWF, e da integrina α 2 β 1 ao colágeno tipo I (Weiss, 1995). Ambos o vWF e a sub-unidade α 2 da integrina α 2 β 1, contêm um domínio tipo A conservado de ~200 resíduos de aminoácidos (Sadler, 1991).

A Jararagina é um inibidor da agregação e adesão plaquetária induzida pelo colágeno (Kamiguti *et al.*, 1995^a). O mecanismo de inibição destas atividades, pela ação da Jararagina, é através da ligação específica da enzima à integrina plaquetária α 2 β 1, que é o principal receptor plaquetário para colágeno tipo I (Emsley, *et al.*, 2000). Kamiguti *et al.*, (1996^a), propuseram que a Jararagina liga-se a subunidade α 2, através do seu domínio tipo desintegrina, ligando-se especificamente ao domínio I da sub-unidade α 2 da α 2 β 1. Esta união é seguida pela proteólise da

cadeia $\beta 1$, que acontece diretamente sobre a superfície da célula, pela ação do domínio metaloprotease. Só a integrina $\alpha 2\beta 1$ intacta encontrada na superfície da plaqueta é susceptível à interação com a Jararagina. A proteólise desta integrina resulta na perda irreversível da sua conformação nativa, que é necessária para a ligação de alta afinidade desta molécula com seus ligantes macromoleculares. Deste modo, a ação proteolítica da jararagina sobre este receptor, interfere em todos os processos de sinalização intracelular, dependentes de colágeno, que são mediados através da $\alpha 2\beta 1$ (Kamiguti *et al.*, 1997).

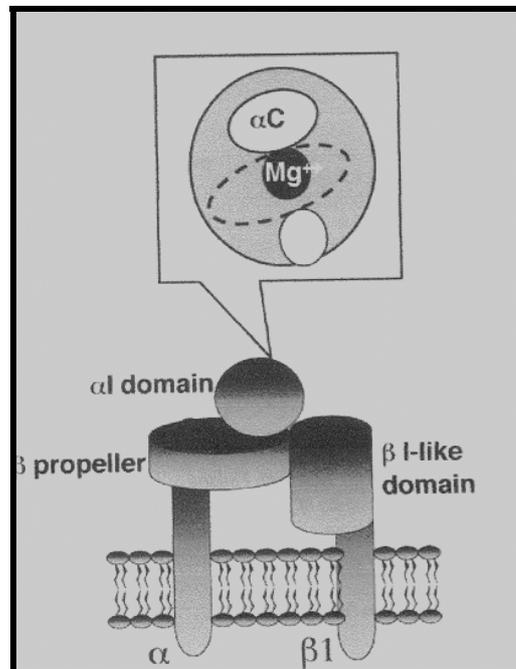


Figura 6. Estrutura da integrina $\alpha 2\beta 1$ (Heino, J., 2000).

Os eventos de sinalização na estimulação das plaquetas por colágeno incluem: a fosforilação tipo tirosina da cadeia γ **FcR** (**Fc Receptor**), da **p72^{syk}** (**Protein 72 Serin-Tirosin Kinase**) e da **PLC γ 2** (**Fosfolipase C- γ 2**), que resulta na ativação destas proteínas. (Fujii *et al.*, 1994). Estes processos são dependentes principalmente da integrina $\alpha 2\beta 1$ (Emsley *et al.*, 2000). Achados de que as **p72^{syk}**

não podem ser fosforiladas em ausência de qualquer dos dois receptores, o $\alpha 2\beta 1$ ou o GP VI, sugere que, a cooperação entre estes dois receptores é necessária para a sinalização induzida pelo colágeno (Ichinoche *et al.*, 1997).

A sub-unidade $\beta 1$ está envolvida na fosforilação e ativação da **p72^{syk}** induzida pelo colágeno, e, o efeito proteolítico da Jararagina sobre esta cadeia interfere principalmente com a fosforilação desta proteína, enfraquecendo a sinalização intracelular dependente deste componente da matriz extracelular (Kamiguti *et al.*, 1997).

1.3.2.2. Potenciador da atividade fibrinolítica do plasma

Os **PA**s (Plasminogen Activators) são serinoproteases, que convertem o plasminogênio em plasmina, causando a degradação do seu substrato natural a fibrina, disparando o processo fibrinolítico (Collen *et al.*, 1980). Existem dois tipos de **PA**s, o **tPA** (Tissue-type Plasminogen Activator) e o **uTA** (Urokinase-type Plasminogen Activator). Tem-se demonstrado que a Jararagina aumenta a atividade fibrinolítica *in vitro* do plasma humano e de outros animais, aumentando a atividade do **tPA**, pela dissociação do complexo do **tPA** com o seu inibidor **PAI-1** (type 1 Plasminogen Activator Inhibitor). Esta **svMP**, também, diminui a atividade do **$\alpha 2$ -PI** (**$\alpha 2$ -Plasmin Inhibitor**) no plasma, dose e tempo-dependente (Sugiki *et al.*, 1995). O **$\alpha 2$ -PI** pertence à superfamília **SERPINS** (Serine Proteases Inhibitors), e rapidamente inativa a plasmina (Holmes *et al.*, 1987). O incremento da atividade da plasmina no plasma causado pela Jararagina sugere que o **$\alpha 2$ -PI** plasmático pode ser inativado e degradado pela ação desta enzima (Sugiki *et al.*, 1995).

1.3.2.3. Degradação de fibrinogênio pela jararagina

A maioria das metaloproteases são α -fibrinogenases. A molécula de fibrinogênio (330 kDa) é um dímero composto de três pares de cadeias unidas por pontes dissulfeto, chamadas de cadeia $A\alpha$, $B\beta$ e γ (Doolittle, 1984). O fibrinogênio funciona como um ligante na agregação plaquetária e um substrato para a trombina na coagulação sanguínea. A estimulação de plaquetas com ADP, adrenalina ou trombina, permite a ligação do fibrinogênio e a agregação plaquetária, pela alteração da conformação da integrina $\alpha IIb\beta 3$. Esta ligação, ativa a $\alpha IIb\beta 3$ através de dois sítios específicos. Um contendo duas seqüências RGD na cadeia $A\alpha$ e outro um dodecapeptídeo C-terminal da cadeia γ (Hawiger *et al.*, 1982). A agregação plaquetária dependente de fibrinogênio em resposta ao ADP, não é afetada pela Jararagina, já que esta **MP** cliva ao fibrinogênio na porção C-terminal da cadeia $A\alpha$, resultando na remoção de um fragmento contendo uma das seqüências RGD, sem mudanças nas cadeias $B\beta$ e γ . A molécula de fibrinogênio restante permanece funcional na agregação plaquetária em resposta a ADP ou adrenalina (Kamiguti *et al.*, 1994). Isto indica que, o dodecapeptídeo C-terminal da cadeia γ , é de fato o principal sítio de ligação do fibrinogênio às plaquetas (Kloczewiak *et al.*, 1984; Kamiguti *et al.*, 1996^a). Porém, este fibrinogênio foi coagulável pela trombina, depois da proteólise da cadeia $A\alpha$ pela Jararagina, mas, a polimerização da fibrina formada a partir deste foi defeituosa (Kamiguti *et al.*, 1994). Estes achados indicam a perda de um sítio de polimerização na região C-terminal da cadeia $A\alpha$. Em conclusão, a Jararagina é uma α -fibrinogenase, mas, esta atividade não é responsável pelo efeito inibitório de plaquetas por esta enzima. A única conseqüência de tal atividade fibrinogenolítica, que contribui a hemostasia defeituosa, é a anormal

polimerização da fibrina observada em fibrinogênio passado a fibrina pela trombina e tratado com Jararagina.

1.3.2.4. *Proteólise do vWF pela jararagina*

O Fator de von Willebran (**vWF**) tem um papel fundamental na hemostasia após a injúria vascular, primeiro ligando-se ao subendotélio, e depois ao receptor plaquetário GPIb (Weiss *et al.*, 1986). Esta reação é o evento primário na formação do tampão hemostático. No plasma, o **vWF** é encontrado na forma de multímeros ligados por pontes dissulfeto (Ruggeri e Ware, 1992). Reduzido, o **vWF** é uma proteína de cadeia simples de 225 kDa e de 2050 aminoácidos. Cada subunidade de **vWF** nativo contém um domínio Val⁴⁴⁹ – Lis⁷²⁸ (responsável pela ligação do **vWF** à **GPIb** induzida por ristocetina) e um sítio de ligação para a integrina plaquetária α IIb β 3, contendo a sequência RGD¹⁷⁴⁴ – ¹⁷⁴⁷ (Titani *et al.*, 1986).

A Jararagina cliva a subunidade **vWF** na metade N-terminal da molécula, dando origem a vários fragmentos. O tratamento de plasma rico em plaquetas com esta **svMP**, também inibe a resposta das plaquetas à ristocetina. É possível, que a Jararagina clive uma parte da molécula **vWF**, o domínio A1, o qual contém o sítio responsável pela ligação do **vWF** à **GPIb** plaquetária. A clivagem do **vWF** pela Jararagina e, provavelmente, por outras enzimas do veneno de *Bothrops jararaca*, contribuem ao processo de hemorragia característico de pacientes com envenenamento. A proteólise de **vWF**, induzida pela Jararagina, junto com seus efeitos sobre a interação plaquetas–colágeno, prejudicam a coagulação, que quando unidos à coagulopatia de consumo, podem implicar risco de vida (Kamiguti *et al.*, 1996^a).

1.3.3 Ação Sobre Componentes da Matriz Extracelular

A Jararagina degrada seletivamente colágeno tipo IV (Mayurama *et al.*, 1992).

A integrina $\alpha 2\beta 1$ liga-se ao colágeno e também está implicada com a reorganização e contração de fibras de colágeno, o qual é importante para o processo de cicatrização dos tecidos (Schiro *et al.*, 1991) e a angiogênese (Senger *et al.*, 1997). A inibição da integrina $\alpha 2\beta 1$ pela Jararagina, pode inibir a angiogênese (ainda que, a mesma proteólise do tecido conectivo, pela atividade catalítica da toxina possa aumentar a angiogênese) (Moura-da-Silva *et al.*, 2001). A ativação do gene da Colagenase-1 ou **MMP-1** (**Matriz Metaloprotease-1**) é dependente da integrina $\alpha 2\beta 1$ (Riikonen *et al.*, 1995), mas também, outras colagenases são induzidas por sinais gerados depois da interação colágeno/ $\alpha 2\beta 1$ (Hornebeck *et al.*, 2002) (Figura 7). A regulação de **MMPs** mediada por integrinas pode ser importante na migração celular, como por exemplo, durante o processo de cicatrização e a invasão de células cancerígenas (Schiro, *et al.*, 1991; Huhtala *et al.*, 1995; Chintala *et al.*, 1996).

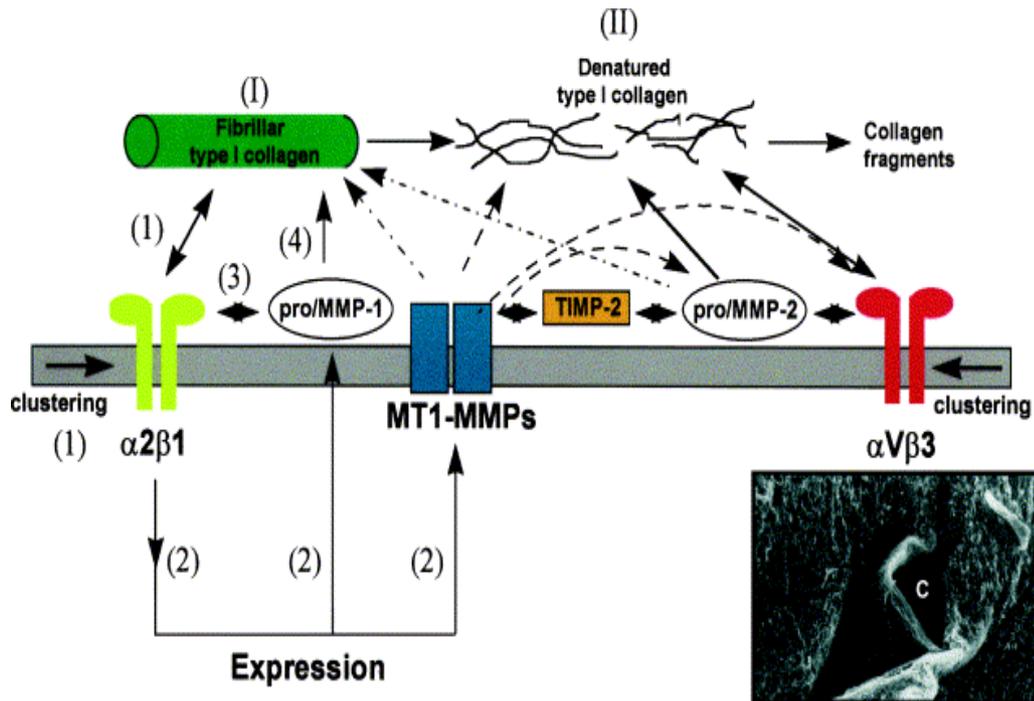


Figura 7. Interação colágeno(s)-célula e colagenólise ETAPA I: (1) colágeno tipo I interage com as integrinas e provoca sua dimerização e ativação; (2) Esta interação induz a expressão das MMP-1 e MT1-MMP; (3) a ligação da MMP-1 à integrina $\alpha 2\beta 1$ favorece sua ativação enzimática; (4) clivagem do colágeno fibrilar. ETAPA II: (1) colágeno desnaturado expõe um sítio críptico reconhecido pela integrina $\alpha V\beta 3$; (2) incremento da MT1-MMP na membrana plasmática, pela ativação do proMMP-2, via formação do complexo (MT1-MMP/TIMP-2/proMMP-2) com a participação da MT1-MMP, isto favorece o processamento final da enzima MMP-2, que degrada tanto colágeno desnaturado quanto o colágeno fibrilar tipo I. Colagenólises do colágeno tipo I pericelular induzida em células de melanoma altamente invasivo. A participação da MMP-1 e MMP-2 ativas, na formação destas cavidades (C) foram demonstradas. Neste modelo a colagenólise pôde ser inibida pela inibição das integrinas tipo $\beta 1$ e $\beta 3$, com anticorpos específicos (William Hornebeck et al, 2002).

1.3.4. Ação Sobre Outras Células não Plaquetárias

Fibroblastos crescidos em contacto com colágeno fibrilar tipo I, adquirem características fenotípicas específicas. A ligação de colágeno ao receptor $\alpha 2\beta 1$ dos fibroblastos, medeia a reorganização e contração da matriz de colágeno e é responsável pela indução da síntese da MMP-1 (Mauch *et al*, 1989), ativação da pró-MMP-2 (Seltzer *et al*, 1994) e aumento da expressão de MT1-MMP, assim como a síntese do próprio receptor (Zigrino *et al*, 2002). Fibroblastos crescidos sobre camadas de Jararagina evidenciam mudanças morfológicas (semelhantes às observadas quando crescidos sobre camadas de colágeno tipo I), indução da MT-1

MMP e MMP-1, e altos níveis de transcrição da subunidade $\alpha 2$. Estes resultados sugerem que a Jararagina age mimetizando o colágeno fibrilar, sobre a $\alpha 2\beta 1$, ativando a transdução de sinais em fibroblastos (Zigrino *et al.*, 2002).

A exposição das células **MPACs** (**M**urin **P**eritoneal **A**dherent **C**ells) à Jararagina, estimula inicialmente (após de 4 horas), a produção de mediadores imunes de amplo espectro como: o **TNF- α** , a **IL-1 β** (**I**nter**L**eukin-**1 β**), e a **IL-6** (**I**nter**L**eukin-**6**). A toxina nativa, também estimula a subsequente degradação das citocinas produzidas por clivagem proteolítica. O **TNF- α** e a **IL-6** foram rapidamente degradadas, enquanto que a atividade sobre a **IL-1 β** foi mínima (Clissa *et al.*, 2001). A suscetibilidade do **TNF- α** e da **IL-6** ao efeito catalítico da Jararagina, não é claro, mas, parece provável que tenha correlação com a presença de pontes disulfeto, presentes no **TNF- α** e na **IL-6** (Callard e Gearing, 1994) e ausentes na **IL-1 β** . Possivelmente, as pontes disulfeto geram características estruturais, que expõem resíduos hidrofóbicos na superfície das moléculas e que são necessários para a atividade proteolítica da Jararagina. Deste modo, a Jararagina na sua forma nativa pode atuar como ativador do mecanismo endógeno da resposta inflamatória (Moura-da-Silva *et al.*, 1996), induzindo a produção de citocinas pela estimulação de células inflamatórias (Clissa *et al.*, 2001).

A Jararagina reconhece a integrina $\alpha 2\beta 1$ em células endoteliais, em diferentes linhagens e com alta seletividade. A jararagina mostrou alta afinidade só com células expressando a integrina $\alpha 2\beta 1$, tais como as **HUVEC** (**H**uman **U**mbilical **V**ein **E**ndothelial **C**ell), **ECV-304** (Variant of T-24 Cancer Cell), que são células que têm o mesmo padrão de expressão superficial de integrinas que as células endoteliais, e as **K562- $\alpha 2\beta 1$** (células $\alpha 2\beta 1$ transfectadas). A interação destas células com o

colágeno foi diminuída pela ação da Jararagina. Em células endoteliais, esta **svMP** interage com suas integrinas tipo $\alpha 2\beta 1$, inibindo a ligação destas células à membrana basal vascular (Moura-da-Silva *et al.*, 2001). A Jararagina induz à quebra das células do endotélio vascular *in vivo* (Kamiguti *et al.*, 1994), mas, não interage com outras integrinas contendo o domínio I, como a integrina $\alpha M\beta 2$ (Moura-da-Silva *et al.*, 2001).

A atividade proteolítica da Jararagina induz o influxo de neutrófilos subcutâneos, pela união direta com os macrófagos teciduais e os monócitos sanguíneos (Costa *et al.*, 2002), através de um sitio de união não caracterizado. A união da $\alpha 2\beta 1$ ao colágeno possui um papel muito importante na migração de neutrófilos, sendo expressa rapidamente após a diapedese dessas células (Werr *et al.*, 2000). A expressão da integrina $\alpha 2\beta 1$ na superfície celular requer da sinalização associada de sinais gerados por fatores quimiotáticos, junto com a sinalização gerada pela ligação de substratos de adesão, como o colágeno e a laminina (Werr *et al.*, 2000). As integrinas são rapidamente expressas em células migrantes, através de mecanismos mediados pelas integrinas $\beta 2$ (Berton e Lowell, 1999). A interação colágeno via $\alpha 2\beta 1$ pode servir para promover a migração de neutrófilos (Werr *et al.*, 2000). Isto, pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias no tratamento de doenças inflamatórias através do uso de antagonistas da integrina $\alpha 2\beta 1$, como a Jararagina.

Em células cancerígenas de melanoma humano **Human Skmel-28**, em cultura, a Jararagina foi efetiva na diminuição das propriedades de adesão em placa à fibronectina, à laminina, ao colágeno tipo I e à gelatina. Foi observada promoção de mudanças na morfologia destas células e nas suas propriedades biológicas. Estes

efeitos foram dose e tempo-dependentes, resultando em um aumento de células mortas e diminuição da viabilidade das mesmas. Neste estudo, o efeito da Jararagina inativa (com 1,10 fenantrolina) teve efeitos maiores, no número de células mortas e na diminuição da viabilidade das mesmas, quando comparadas com a enzima ativa. Este efeito, possivelmente aconteça porque as proteínas induzidas, que potencializam os efeitos sobre a viabilidade celular, são degradadas pela Jararagina ativa, mas não pela enzima com o domínio metaloprotease inativo, o que faz que as proteínas não degradadas aumentem a toxicidade desta proteína inativa (Corrêa *et al.*, 2002). A ligação da toxina tem um efeito inibitório, estatisticamente significativo, sobre a invasão celular, particularmente em células tratadas com a Jararagina ativa (Corrêa *et al.*, 2002).

O tratamento com Jararagina causou uma redução significativa do número de metástase pulmonar de camundongos **AIRmin** (Corrêa *et al.*, 2002). A habilidade desta enzima para diminuir o número de casos de metástase *in vivo*, aponta para um potencial uso desta toxina neste campo.

1.3.5. Outras Atividades Enzimáticas

A Jararagina pode processar o **TNF- α** (Tumoral Necrosis Factor- α) recombinante a partir de seu precursor pro-TNF α , liberando a forma ativa deste fator, através da clivagem na posição entre os resíduos Ala⁷⁶ e Val⁷⁷, de um jeito análogo à **ADAM-17** (A Desintegrina A Metaloprotease) ou **TACE** (TNF- α Converting Enzyme) (Moura-da-Silva *et al.*, 1999).

Outra atividade enzimática descrita para a Jararagina é a geração de peptídeos tipo angiostatina (inibidor endógeno da angiogênese), produzidos a partir da digestão *in vitro* do plasminogênio (Ho *et al.*, 2002).

Desta forma, a Jararagina vem sendo utilizada como metaloprotease modelo para estudos de biologia celular e molecular. A sua estrutura cristalográfica foi parcialmente resolvida (somente o domínio catalítico por Souza *et al.*, (2001)).

Para contribuir com a compreensão do mecanismo de ação desta toxina, pensou-se em produzir a Jararagina recombinante, com os domínios separadamente, para estudar os efeitos produzidos isoladamente. Além disso, pouco se sabe sobre o efeito das modificações pós-traducionais, em especial, a glicosilação, nos efeitos desta importante metaloprotease de veneno de serpente.

1.4 GLICOSILAÇÃO

Muitas proteínas, particularmente em células eucarióticas, são modificadas pela adição de carboidratos, em um processo chamado de glicosilação. Glicosilação e processamento de oligossacarídeos, possuem um papel indispensável na distribuição e endereçamento de proteínas para seu apropriado destino celular (Varki, 1993).

Geralmente, as glicoproteínas são secretadas ou localizadas na superfície da célula, embora, algumas proteínas nucleares e citosólicas também sejam glicosiladas (Kornfeld e Kornfeld, 1985). As glicoproteínas podem ser N- ou O-glicosiladas, dependendo do tipo de ligação do carboidrato à cadeia lateral do aminoácido, sendo glicosilação do tipo N, quando o carboidrato se liga ao átomo de nitrogênio da cadeia lateral da asparagina; e O-glicosilação, quando o carboidrato se liga ao átomo de oxigênio de cadeia lateral da treonina ou da serina (Kobata, 1992).

As N-glicoproteínas são formadas no retículo endoplasmático e posteriormente processadas no aparato de Golgi. A síntese do seu motivo de carboidrato acontece em quatro etapas (Kornfeld e Kornfeld, 1985) (Figura 8):

- *Síntese de um oligossacarídeo precursor ligado a um lipídeo.* O lipídeo neste processo é o dolicol, o qual, está ligado ao oligossacarídeo precursor, através de uma ponte piro-fosfato. A via de síntese do oligossacarídeo envolve adição de unidades de monossacarídeos a um glicolipídeo por específicas glicosiltransferases, para formar um oligossacarídeo conservado de 14 açúcares, o (N-acetilglicosamina)₂ (manose)₉ (glicose)₃. O dolicol com o

oligossacarídeo, aparentemente, estão ancorados na membrana do retículo endoplasmático.

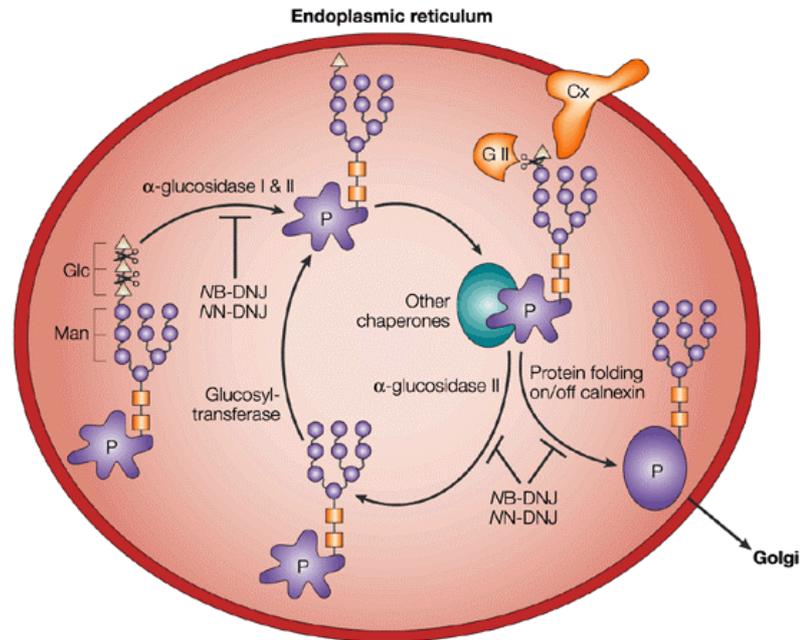


Figura 8. Processo de Glicosilação. Fase inicial de adição do oligossacarídeo formando o 'núcleo' conservado no Retículo Endoplasmático e a fase final de adição e remoção de outros resíduos de carboidratos no Complexo de Golgi (Kornfeld e Kornfeld, 1985).

- *Transferência do oligossacarídeo precursor ao grupo amino de uma Asn, de uma cadeia de aminoácidos em crescimento.* Esta adição acontece em uma seqüência específica, o motivo N-X-S/T, sendo X, qualquer aminoácido, exceto prolina, glutamato ou aspartato. Somente uma terceira parte destes potenciais sítios de glicosilação nas proteínas eucarióticas estão efetivamente N-glicosiladas. A aplicação de algoritmos de predição de estruturas às seqüências de aminoácidos, contornando conhecidos sítios de N-glicosilação, sugerem que estes sítios acontecem em β -giros nos quais o nitrogênio, da cadeia lateral do Asn, está formando uma

ligação de hidrogênio com o oxigênio do grupo hidroxila da Ser/Tre. Isto explica porque a Pro não pode ocupar a posição X, já que, poderia prevenir que o motivo N-X-S/T, assuma a putativa conformação requerida para a formação da ligação de hidrogênio. Esta última explicação também se aplica à exceção para os aminoácidos ácidos.

- *Remoção de alguns açúcares no oligossacarídeo precursor.* Após uma modificação o glicoconjugado passa para o complexo de Golgi, aonde são removidos açúcares do oligossacarídeo, em reações catalisadas por glicosiltransferases.
- *Adição de resíduos de açúcares ao núcleo do oligossacarídeo remanescente.*

As vantagens biológicas da adição de oligossacarídeos às proteínas não estão completamente elucidadas. Os resíduos muito hidrofílicos de carboidratos, alteram a polaridade e solubilidade das proteínas às quais estão conjugados. No complexo de Golgi, a cadeia de oligossacarídeo adicionada à recém sintetizada proteína, pode influenciar a seqüência de eventos do enovelamento que determinaram a estrutura terciária da proteína. Interações estéricas entre peptídeos, podem precluir uma rota de enovelamento, favorecendo outra. Quando numerosos oligossacarídeos, negativamente carregados, se ligam a uma proteína, as cargas de repulsão entre eles favorece a formação de uma estrutura estendida nesta região. A carga fortemente negativa da cadeia oligossacarídea também protege algumas proteínas do ataque por enzimas proteolíticas (Opdenakker *et al.*, 1993).

Além dos efeitos físicos globais sobre a estrutura da proteína, estão os efeitos biológicos específicos das cadeias de oligossacarídeos nas glicoproteínas. Os resíduos de ácido siálico, situados no final da cadeia de oligossacarídeo de muitas proteínas, protegem contra a degradação no fígado. No caso da ceruloplasmina, uma proteína transportadora com várias cadeias de oligossacarídeos terminadas em ácido siálico, a remoção destes resíduos pela enzima sialidase é uma forma do corpo marcar as proteínas velhas para sua destruição e substituição. Alguns hormônios peptídeos, que circulam no sangue, tem motivos de oligossacarídeos que influenciam seu tempo de vida na circulação. Muitos vírus animais, incluindo o vírus da Influenza, aderem a célula hospedeira através das interações com oligossacarídeos localizados na superfície celular (Sharon e Lis, 1993; Gahmberg e Toluanen, 1996).

Como descrito anteriormente não se conhece o padrão de glicosilação nem o papel dos glicanos ligados à Jararagina, na sua atividade. Desta forma, a produção da Jararagina recombinante pode trazer uma contribuição significativa nesta área.

2. OBJETIVOS

- Elucidar possíveis elementos responsáveis pela atividade hemorrágica da jararagina, usando a proteína nativa e modificada *in vitro*, assim como a proteína expressa em bactéria, para a realização de ensaios hemorrágicos e proteolíticos.
- Subclonar, expressar em *Escherichia coli*, purificar e re-novelar o domínio catalítico-metaloprotease da Jararagina.
- Determinar a atividade catalítica direta da proteína recombinante do domínio catalítico da jararagina (**rCDJARA**) sobre diferentes substratos (colágenos tipo I, tipo IV, fibronectina, gelatina e fibrinogênio).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. cDNA e Plasmídeos

O cDNA molde da Jararagina completa (Gene Bank No. de Acesso X68251) foi isolado desde colônias bacterianas recombinantes de *Escherichia coli* BL21(DE3) com o vetor PEZZ18 que contem o inserto do DNA codificante para a proteína Jararagina completa, este clone foi denominado **PEZZ18JARA**.

Para a subclonagem foram utilizadas colônias altamente competentes de linhagens de *E.coli* TOPO 10 (linhagem para clonagem com White/Blue screening sem IPTG), DH5 α (linhagem para clonagem) e BL21 (DE3) (linhagem de expressão), mantidas em estoque de glicerol a – 80 °C.

Como vetor de clonagem foi usado o pCR 2.1 TOPO da Invitrogen, um sistema altamente eficiente para inserção direta do produto de PCR em um vetor plasmidial “ativado” (com uma 3’ timidina ancorada), através de uma reação catalisada pela enzima topoisomerase I, sem requerer ligases ou procedimentos pós-PCR (Figura 9). Este vetor tem na sua seqüência sítios para diversas enzimas de restrição o que facilita a passagem para vetores de expressão (Figura 10).

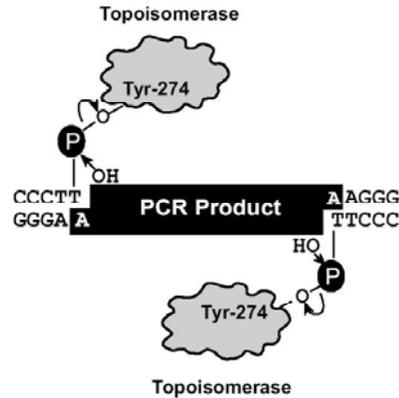


Figura 9. Ligação do inserto ao vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO ativado com 3'timidina ancorada. Esta reação é mediada pela enzima topoisomerase I (Manual de instruções TOPO TA Cloning – Invitrogen).

Como vetor de expressão foi usado o sistema pET28a da Novagene, com promotor T7 (que permite a transcrição pela T7 RNA polimerase), sítios de múltipla clonagem para diversas enzimas de restrição, (*Bam*HI e *Xho*I, entre outras) e com a seqüência His-Tag que se liga a resinas de quelação de metais, o que permite a fácil purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. Outra característica deste vetor é a presença de um sitio de clivagem específico para a trombina humana. Este vetor permite a produção de proteínas recombinantes como produto de fusão com um peptídeo N-terminal rico em His (Figura 11 e 12).

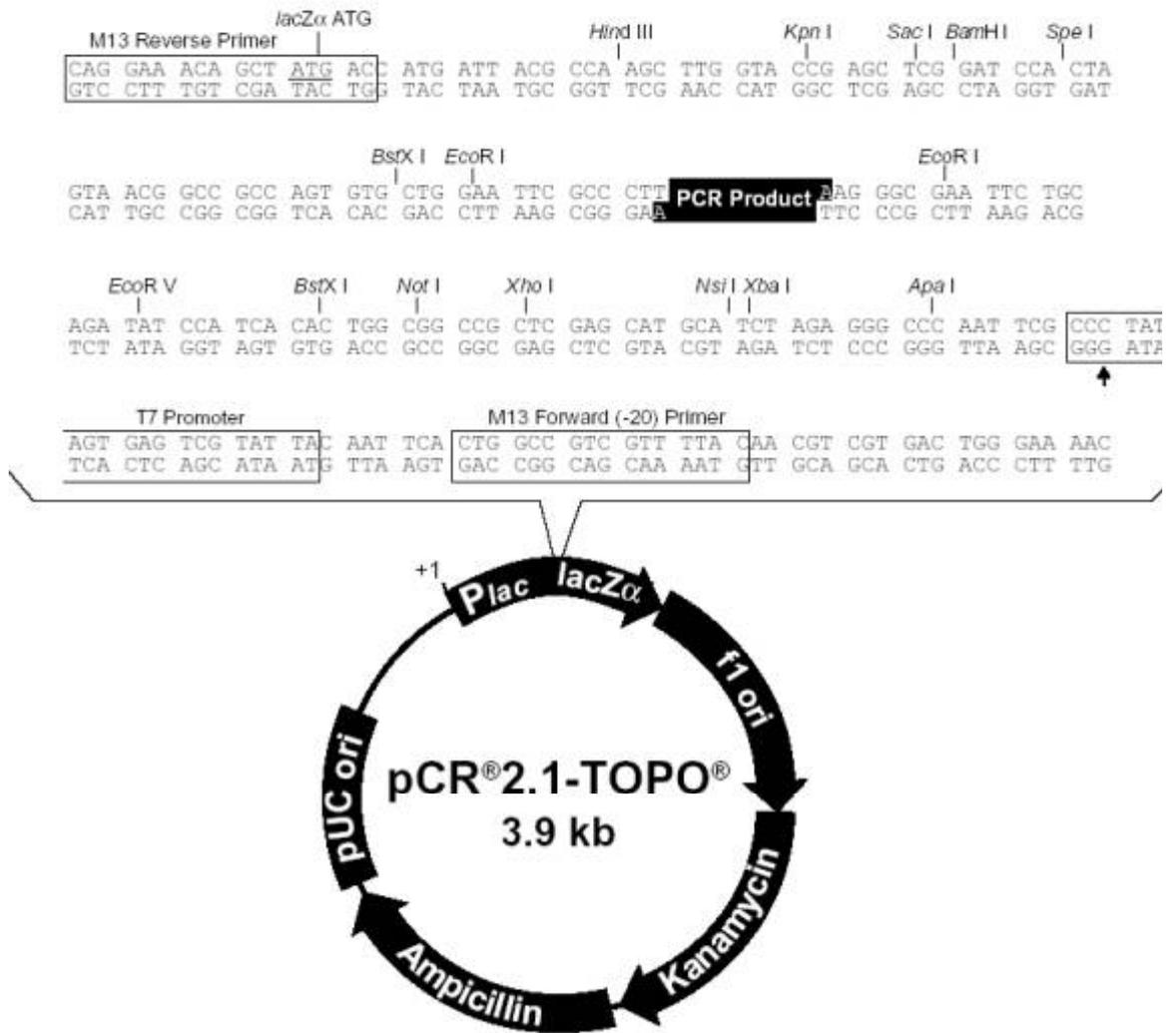


Figura 10. Esquema do vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO mostrando em ênfase a região de clonagem (Manual de instruções TOPO TA Cloning – Invitrogen).

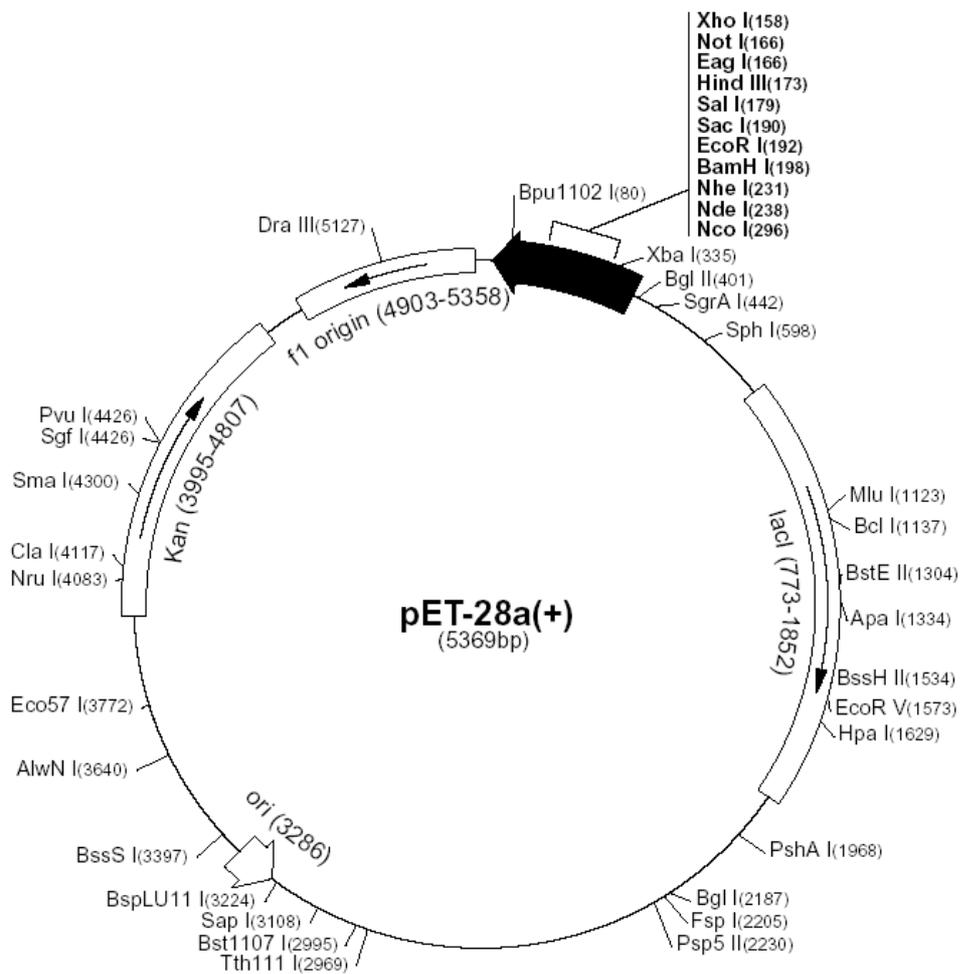


Figura 11. Esquema do vetor de expressão pET28a (Manual de Instruções pET Cloning – Novagen).

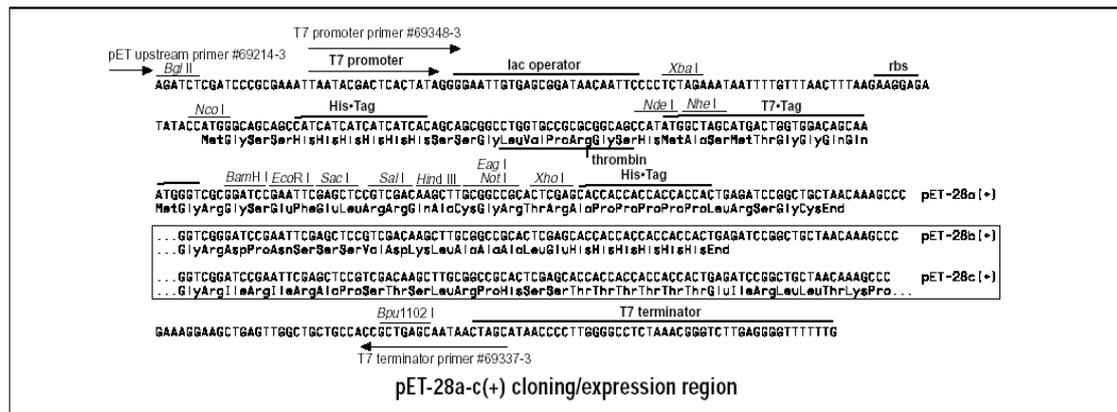


Figura 12. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da região de expressão e clonagem do Vetor de expressão pET 28a (Manual de Instruções pET Cloning – Novagen).

3.1.2. Oligonucleotídeos Iniciadores

Os “Primers” foram desenhados a partir da seqüência do domínio catalítico da Jararagina e sintetizados pela Invitrogen, sendo:

- **Jara F** (Primer Forward):

5'-CGC-GGATCC-GAACAACAAAGATATGAC-3', correspondente à seqüência da região de DNA que limita o extremo 5' da fita molde do domínio catalítico. Na extremidade 5' do primer foi adicionado sítio de restrição para *Bam*HI.

- **Jara R** (Primer Reverse):

5'-TCC-AAGCTT-TTA-CACCTCCAAAAGTTC ATT-3'; correspondente à seqüência complementar da região de DNA que limita o extremo 3' da fita molde do domínio catalítico. Na extremidade 5' do primer foi adicionado um sítio de restrição para *Hind*III e um 'stop'codon.

3.1.3. Anticorpos

- **Anti-jararagina:** anticorpo de origem policlonal obtido pela imunização de camundongos utilizando a Jararagina nativa.
- **Anti- IgG** de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Sigma).

3.1.4. Animais

Os experimentos envolvendo animais foram realizados com camundongos machos albinos, pesando entre 22 e 25 gramas, criados e mantidos pelo Biotério

Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os experimentos foram realizados no Biotério do Departamento de Ciências Fisiologia da UFSCar. Todos os animais foram mantidos em dieta de ração e água *ad libitum*.

3.1.5 Outros Reagentes

- Enzimas de restrição: *BamHI*, *EcoRV*, *HindIII* e *XhoI* da Invitrogen.
- Enzima T4 DNA ligase e reagentes da PCR da Gibco.
- Padrões de massa molecular: High DNA Mass Ladder, Low DNA Mass Ladder e Benchmark Protein Ladder da Invitrogen.
- Reagente de isolamento e purificação de plasmídios: Wizard Plus Miniprep DNA Purification System da Promega.
- Reagentes para a purificação de DNA: DNA Purification Kit da *BioRad* e MicroSpin S-200 HR Columns da Amersham Bioscience.
- Reagente para dosagem de proteínas: *BioRad* Protein Assay, Nitroblue tetrazolium chloride (NBT) e 5-bromo-4 chloro-3 indolyl phosphate (BCIP), peptide-N-glycosidase F (PNGase F) da *BioRad*.
- Reagente para dosagem de uréia: Kit Labtest Diagnostica da Labtest Diagnostica.
- Isopropil tio- β -D-galactopiranosido (**IPTG**), Imidazol, DNase I, RNase A , hidrocloreto de guanidina e Fibrinogênio bovino da Sigma
- Uréia da Promega.

- Membranas: Membrana de nitrocelulose – Hybon–C da Amershan Biosciences; Membrana Immobilon PVDF e Filtro Millex –GS 0,22 um e 0,45 um da Millipore; Diaflo-Ultrafiltration Membranes da Amicon.
- Material para cromatografia: Resina Ni-NTA da Quiagen.
- Fibronectina humana e Colágeno tipo IV da Invitrogen.
- Colágeno tipo I in 0,1% de ácido acético foi isolado de serosa de pericárdio bovino.
- Jararagina nativa foi purificada a partir do veneno de *Bothrops jararaca* como previamente descrito (Paine *et al.*, 1992).
- Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.6. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: GeneAmp PCR system 2400 da Perkin-Elmer, Centricon-3 e Centriprep-10 da Amicon, Stirred Ultrafiltration Cells da Amicon, Câmera Kodac DC120, ScanJet Scanner Hewlet Packard, Orbital Shaker da Forma Scientific, White/2UV Transiluminator da UVP, Fluorímetro Hitachi F-2000, ABI Prism 377 DNA Sequencer da Perkin Elmer, Centrifuga Sorvall da Eppendorf, Espectrofotômetro e Coletor de Frações da Amershan Biosciences.

3.1.7. Linhagens de *E.coli*

- DH5 α : F $^{-}$ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA $^{-}$ arg $^{-}$ F) U169 deoR recA1 end A1 hsdR17 (r $_{k}^{-}$ m $_{k}^{+}$) phoA supE44 λ^{-} thi-1 gyrA96 relA1 (Gibco).
- BL21 (DE3): F $^{-}$ *ompT* hsdS $_B$ (r $_{B}^{-}$ m $_{B}^{-}$) gal dcm (DE3) (Novagen).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Amplificação do cDNA do Domínio Catalítico da Jararagina

O DNA que codifica para a Jararagina completa foi obtido a partir da colônia recombinante *E.coli* BL21(DE3) **PEZZ18JARA**, previamente descrita. Das colônias recombinantes foram isolados e purificados os plasmídeos. A partir deste produto, se gerou a seqüência codificante para o **Domínio Catalítico da Jararagina (CDJARA)**, através da técnica do PCR, com oligonucleotídeos iniciadores específicos (**Jara R** e **Jara F**) para o domínio metaloprotease, sintetizados pela invitrogen. O protocolo seguido para a reação de PCR foi a seguinte:

Tabela 1. Protocolo de reação de amplificação da região correspondente ao domínio catalítico da jararagina.

COMPONENTE	QUANTIDADE (μL)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água mili Q	33,8	
Tris-HCl 50 mM	20	10 mM
MgCl ₂ 25 mM	6	1,5 mM
KCl 200 mM	25	50 mM
dNTP 10 mM	2	0,2 mM
Primer Jara F 10 μM	4	0,4 μM
Primer Jara R 10 μM	4	0,4 μM
DNA molde 0,3 ng/ μL	4	0,012 ng/ μL
Taq DNA pol.	1,2	0,012 U/ μL
<i>TOTAL</i>	100	

A reação de PCR foi realizada no GeneAmp PCR system 2400 da Perkin-Elmer, da seguinte forma: um ciclo de 94 °C por 5' e 30 ciclos de: 92°C por 45'';

55⁰C por 1'; 72⁰C por 1'. No ciclo final foram adicionados 30 minutos a 72⁰C para uma pós-amplificação da extremidade 3' e terminando com 4⁰C para armazenamento. O resultado da PCR foi verificado em gel de agarose 1% e revelado com brometo de etídeo. A banda resultante foi purificada através dos sistemas de extração de DNA Purification Kit da *BioRad* e MicroSpin S-200 HR Columns da Amershan Biosciences. O DNA purificado foi chamado de inserto **CDJARA** e foi utilizado diretamente para a reação de clonagem no vetor pCR 2.1 TOPO.

3.2.2. Subclonagem no Vetor de Clonagem

O produto da PCR purificado e fresco foi utilizado como inserto na reação de clonagem no sistema pCR 2.1 TOPO. O vetor e o inserto foram colocados na reação em uma proporção molar de 1:4, respectivamente, junto com as sais (NaCl 200mM e MgCl₂ 10mM) e a topoisomerase I do kit TOPO Cloning Reaction. A reação foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Depois deste tempo, procedeu-se à transformação das células TOP10 One Shot Chemically Competent *E.coli*. Cerca de 10-50 µL das células transformadas foram plaqueadas em placas seletivas de SOC Agar com 50 µg/mL de Kanamicina e 40 µL de X-Gal 40 mg/mL. As colônias recombinantes foram duplamente selecionadas através de crescimento seletivo e por screening White/Blue sem IPTG. As colônias brancas foram selecionadas e analisadas por lise alcalina e submetidas a ensaio de restrição com *EcoRV* e *BamHI* e o resultado analisado por gel de agarose.

O inserto **CDJARA** foi subclonado no vetor de expressão pET28a. Para isso, o DNA do inserto junto com o plasmídeo pCR 2.1 TOPO, foram extraídos por

lise alcalina das colônias recombinantes. Após uma reação de restrição com *XhoI* e *BamHI*, o inserto foi observado em gel de agarose 1% e revelado com Brometo de Etídeo 10mg/mL, de onde foi quantificado (com auxílio do programa Kodac Digital Science 1D), extraído e purificado. O vetor pET28a foi submetido ao mesmo tratamento que o inserto.

A reação de ligação do inserto com o vetor de expressão pET28a foi catalisada pela enzima T4 DNA ligase. Utilizou-se uma proporção molar de vetor:inserto de 1:4, respectivamente. A reação foi incubada durante 16 h a 16^oC. Cerca de 5 µL da reação de ligação foram utilizados para transformar células altamente competentes da linhagem de propagação *E.coli* DH5α. As colônias recombinantes foram selecionadas em meio LB-Kanamicina 30µg/mL, e logo submetidas a lise alcalina para extração do plasmídeo e análise de restrição com *XhoI* e *BamHI*. A seqüência do inserto **CDJARA** e a direção de leitura foram conferidos pelo seqüenciamento de DNA. Células BL21(DE3) foram transformadas com o pET28a contendo o inserto **CDJARA** para os posteriores ensaios de expressão.

3.2.3. Transformação de Células Competentes

Para os ensaios de transformação foram utilizadas células quimicamente competentes de *Escherichia coli* das linhagens:

- DH5α: linhagem que permite a propagação do plasmídeo.
- BL21 (DE3): possui o gene que codifica para a T7 RNA polimerase e carece das proteases *OmpT* e *LonI*, favorecendo a super-expressão das proteínas heterólogas (Figura 13).

Estas células foram preparadas a partir de monoculturas na fase logarítmica de crescimento (D.O.₆₆₀ entre 0,4-0,6). Foi empregada uma solução de CaCl₂ 50 mM estéril para o preparo da membrana das células para a transformação através da técnica de choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989).

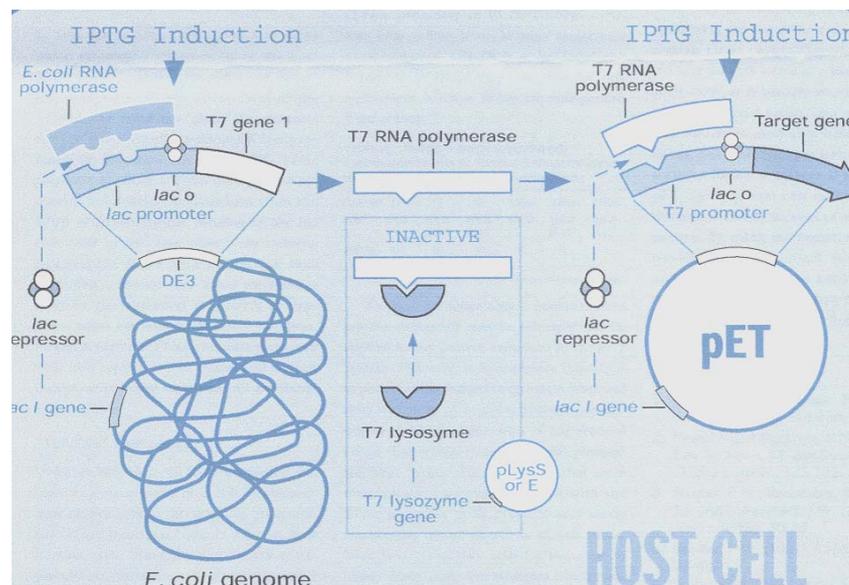


Figura 13. Elementos de controle do sistema pET. (Mierendorf *et al.*, 1994. Novagen Innovations).

3.2.4. Seqüenciamento de DNA

O DNA plasmidial das colônias recombinantes foi seqüenciado pelo método de nucleotídeos de terminação.

Os ensaios de seqüenciamento de DNA foram gentilmente realizados pelo Laboratório de Biologia Molecular Estrutural do Instituto de Física da USP-São Carlos, sobre a supervisão do Prof.Dr. Otavio Thiemann, pelo método de nucleotídeos de terminação, utilizando um seqüenciador automático ABI Prism 377 DNA Sequencer da Perkin Elmer. As concentrações dos primers foram ajustadas para 5 pmoles/ μ L e do DNA para 120 ng/ μ L.

3.2.5. Expressão

A expressão e purificação da **CDJARA** recombinante foi feita segundo a metodologia descrita por Ramos *et al.*, (2003), com algumas modificações. O tempo, a temperatura e a concentração de IPTG foram testados para escolher as condições ótimas de expressão da **rCDJARA**. Para a expressão foi feito um inóculo em LB seletivo com kanamicina a partir de uma única colônia recombinante de *E.coli* **pET28a-BL21-(DE3)-CDJARA**. O inóculo foi crescido durante 16 horas a 37 °C e logo foi diluído 1:50 com meio LB seletivo fresco. Colocou-se para crescer novamente a 37 °C, até que, a densidade ótica da cultura, a 660 nm atingisse ~0,6. Neste ponto, a cultura foi induzida com IPTG, em uma concentração final de 0,5 mM. O tempo de expressão foi três horas a 37 °C. Após este tempo, a cultura foi centrifugada a 4°C, por cinco minutos a 5000 g, em uma centrífuga Sorvall RC 5C Plus. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em tampão de ligação 1X (Imidazol 5 mM; NaCl 0,5 M; Tris-HCl 20 mM pH 7,9) e deixado em gelo durante meia hora e sonificado. Logo, a suspensão foi centrifugada a 13000 g a 4 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso novamente em tampão de ligação 1X com uréia 6M e deixado uma hora a temperatura ambiente. Procedeu-se então a uma nova centrifugação, nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi separado cuidadosamente e armazenado a -20 °C, e usado nas próximas etapas de purificação. Todas as fases deste processo foram analisadas por SDS-PAGE.

3.2.6. Purificação da Proteína Recombinante

A fração sobrenadante com uréia do item anterior foi filtrada e submetida a purificação em coluna de Níquel-Ácido Nitriloacético (Ni-NTA) da Qiagen, sob fluxo constante de 0,5 mL por minuto. Esta cromatografia baseia-se no princípio de quelação de metal (Schmitt *et al.*, 1993). A resina de níquel tem alta afinidade por biomoléculas de polihistidina (seis resíduos de histidina consecutivos, 6xHis-tag), presentes no peptídeo de fusão N-terminal da proteína recombinante. Esta ligação é estável em uma ampla variedade de condições, especialmente, sob condições estridentes de lavagem, permitindo a purificação de proteínas que representam até 1% da proteína total, com homogeneidade maior que 95% em um único passo.

A coluna foi previamente equilibrada com 4 volumes de tampão de ligação desnaturante (Imidazol 5mM; NaCl 0,5mM e Tris-HCl 20mM pH 7,9, com uréia 6M). O mesmo tampão foi empregado na primeira lavagem após a aplicação da amostra. Foram realizadas lavagens subsequentes, para a remoção das proteínas ligadas inespecificamente com tampões de lavagem (NaCl 125 mM, Tris-HCl 20mM pH 7,0 uréia 6M) com concentrações variáveis de Imidazol entre 5–20 mM. A proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição (NaCl 0,5mM; Tris-HCl 20mM pH 7,0 e uréia 6M; Imidazol 0,5M). As frações foram coletadas com auxílio de um coletor automático (Amershan Bioscience), sendo o tempo de coleta definido em três minutos.

3.2.7. Enovelamento *In Vitro*

O procedimento de enovelamento foi realizado segundo a metodologia descrita por Itoh *et al.*, (1996), mas com as modificações introduzidas por Selistre-

de-Araujo *et al.*, (2000), para a remoção do agente desnaturante com sucessivas diálises. A proteína purificada foi diluída para o dobro de seu volume inicial ($2V_0$) (aprox. 15 μg de proteína recombinante) em tampão de redução (Tris-HCl 50mM, pH 8,5; DTT 10 mM; Uréia 6M) e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, quando foi diluída para um volume final de $5V_0$ com tampão de oxidação (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, cisteína 5 mM; cistina 1mM; CaCl_2 5mM; ZnCl_2 100 μM e uréia 6M). A proteína diluída foi dialisada contra tampão de oxidação contendo quantidades decrescentes de uréia (partindo de 3M, passando por 1.5M, 0.75M até 0M de uréia). A remoção de uréia foi acompanhada por dosagens enzimáticas empregando-se urease (Kit Labtest Diagnostica).

3.2.8. Estimativa da Concentração Protéica

A concentração protéica das amostras provenientes da cromatografia foi estimada através do método descrito inicialmente por Bradford, (1976). Para este ensaio foi utilizado o reagente Bradford da *BioRad* e uma curva padrão com soro albumina bovina (BSA) da Cultilab, nas concentrações de 0,2 ng/mL – 1,0 mg/mL. Foram transferidos 1,25 mL do reagente Bradford em cada tubo, em duplicata e adicionados 25 μl dos pontos da curva padrão ou das amostras a serem dosadas. A reação foi agitada e após cinco minutos submetida a leitura de absorvância a 595 nm, em um espectrofotômetro da Amershan Biosciences. A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão de BSA, plotada e analisada por regressão linear no programa de análise de curva Swift II.

3.2.9. Eletroforese em Gel de Agarose

Os procedimentos que envolvem DNA foram acompanhados por eletroforese de gel de agarose 1% e reveladas com brometo de etídeo 10 mg/ml (Sambrook *et al.*, 1989), com o auxílio de transiluminador UV a 302 nm.

3.2.10. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os procedimentos de expressão, purificação e alguns procedimentos de atividade da **rCDJARA** foram acompanhados por eletroforese de poliacrilamida na presença de SDS conforme descrito por Laemmli (1970). As frações correspondentes às proteínas foram diluídas em meio volume de tampão de amostra (Tris/HCl 125 mM pH 6,8; 4% de SDS; 20% de glicerol; 0,01% de azul de bromofenol), reduzidas com 5% de beta-mercaptoetanol e fervidas por 5 minutos. O material foi então aplicado em um gel de empilhamento de 5% e gel de resolução de 12,5% de poliacrilamida e submetido a eletroforese com corrente elétrica estabelecida de 15 mA e voltagem até 125 V, durante uma hora. Os géis foram corados com uma solução corante (0,25% de azul de comassie R-250 dissolvidos em 50% isopropanol e 10% ácido acético), diluídos em água destilada e filtrados e descorados com uma solução 10% de ácido acético e 50% de metanol.

3.2.11. Documentação de Imagens

Para a documentação de imagens a partir de géis de agarose e de poliacrilamida foi utilizando um transiluminador equipado com lâmpada U.V. e luz visível e uma câmara Kodac Digital Science DC120, Para a captura de imagens de

membranas de nitrocelulose (immunoblotting) foi utilizado o ScanJet Hewlett Packard.

3.2.12. Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica da **rCDJARA** foi testada como descrito previamente por Johnson *et al.*, (1993). Camundongos machos foram anestesiados e diferentes amostras de **rCDJARA** foram injetadas intradermicamente, em um volume final de 100 μ L. Os animais foram sacrificados três horas após a injeção e a pele do dorso retirada para a medida da área hemorrágica. Foi considerada como uma unidade de atividade hemorrágica um halo hemorrágico de 1 cm (produto de maior diâmetro da área de hemorragia pelo diâmetro perpendicular a este).

3.2.13. Atividade Proteolítica Sobre Substratos Naturais

Soluções de fibronectina (Invitrogen), fibrinogênio (Sigma), colágeno tipo I e colágeno tipo IV (Invitrogen), foram preparadas em tampão Tris-HCl 50 mM; NaCl 10 mM; CaCl₂ 2mM, pH 8,5 (Baramova *et al.*, 1991). A incubação da **rCDJARA** com cada substrato foi realizada como descrito por Rucavado *et al.*, (1995), em diversas proporções substrato: enzima. Os substratos incubados sem a enzima foram utilizados como controle. Após a incubação por 1 h, 6 h e 24 h a 37 °C, alíquotas foram retiradas, adicionadas ao tampão de amostra contendo mercaptoetanol e fervidas por 3 min. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 10% e as proteínas foram visualizadas através da coloração do gel com azul de Comassie Brillhante.

3.2.14. Zimografia

Para detectar e caracterizar a atividade proteínase da **rCDJARA** foi utilizada a gelatina como substrato nos géis de zimografia. Cerca de 5µL de cada enzima foram misturados com tampão de amostra 5X e aplicados em gel SDS-PAGE 10%, copolimerizados com gelatina 2 mg/mL. Após a eletroforese a 4 °C, o gel foi incubado em 2,5% de Triton X-100 por 30 min e em seguida o gel foi incubado em tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; CaCl₂ 5 mM; 0,02% de NaN₃). Após esta etapa, o gel foi corado com Comassie R-250 e descorado com 10% de ácido acético 40% de metanol, até a visualização das bandas de degradação.

3.2.15. Western Blot

A técnica de *Western blot* foi utilizada para observar a expressão da proteína correspondente ao domínio catalítico, nas diferentes frações celulares. A amostra foi aplicada no gel SDS-PAGE 12,5%. Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. O anticorpo primário foi utilizado em uma diluição 1:5000, A reatividade foi detectada pelo anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, e, para o desenvolvimento da coloração foram utilizados os agentes cromogênicos NBT e BCIP (*BioRad*). Para o procedimento de transferência foi utilizado o aparelho *TransBlot SemiDry* da *BioRad*.

3.2.16. Parâmetros Cinéticos

Os ensaios com peptídeos fluorogênicos foram realizados em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, a 37° C, em um volume final de 1,5mL. A hidrólise foi determinada continuamente em um fluorímetro Hitachi F-2000 por medição da fluorescência a $\lambda_{em}=420$ nm e $\lambda_{ex}=320$ nm seguindo o procedimento descrito (Chagas *et al.*, 1990). A inclinação foi convertida em μ mol de substrato hidrolisado/min baseado na curva de calibração obtida da hidrólise completa de cada peptídeo. Os parâmetros cinéticos, para o substrato Abz-LVEALYQ-EDDnp foram calculados por análise de regressão não linear da velocidade inicial de hidrólise de substrato usando o programa Grafit (Erithacus Software, Staines, UK.). O desvio padrão dos valores do k_{cat} e K_m foram menores que 5%. Os valores de eficiência catalítica foram calculados como a razão resultante de k_{cat}/K_m .

3.2.17. Deglicosilação Enzimática da Jararagina Nativa

A proteína nativa foi deglicosilada utilizando a enzima peptide-N-glycosidase F (PNGase F) de *BioRad*. Cerca de 12 μ L de Jararagina (22 μ g, em 20mM de tampão fosfato de sódio, pH 8,5) foram incubados com 2 μ L da PNGase F por 24h a 37°C. A reação de deglicosilação foi confirmada pela variação na mobilidade da proteína no SDS-PAGE. Um controle foi montado com a Jararagina nativa submetida às mesmas condições de reação, mas, sem a adição da enzima PNGase F.

3.2.18. Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros de CD foram registrados usando o espectropolarímetro Jasco J-720, em comprimento de onda de 193 a 250 nm. As medições foram feitas com as proteínas recombinante e nativa em concentrações entre 0.15-0.2 mg/mL, em cuvetas de quartzo de um 1mm de comprimento. Os espectros foram resultado da média de 16 medições. O espectro de CD foi medido em Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 e medido em unidades de miligraus de elipticidade $[\theta]$, a qual foi transformada em elipticidade molar $[\theta]$ usando a massa molecular e a concentração usada de cada proteína.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS PRELIMINARES

O cDNA que codifica para a Jararagina completa (domínio metaloprotease/desintegrina/rico em cisteína) foi clonada com sucesso no Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, coordenado pela Profa. Dra. Ana Maria Moura da Silva, em linhagens de *Escherichia coli* BL21 (DE3), utilizando como vetor o sistema PEZZ18 da Pharmacia. O inserto foi amplificado pela técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores, correspondentes à seqüência da Jararagina madura e com sítios de restrição para a enzima *Xho*I, no extremo 5', e para a enzima *Not*I no extremo 3'. As colônias recombinantes foram designadas **PEZZ18JARA**. O clone foi gentilmente cedido.

4.2. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA JARARAGINA

O produto da PCR utilizando **PEZZ18JARA** como molde e os primers **JaraF** e **Jara R**, foi analisado por eletroforese de agarose, observando-se a banda correspondente à seqüência de DNA do **CDJARA**, com 669 pb de comprimento

total. (a seqüência de DNA da Jararagina completa tem 2018 pb). A banda foi cortada e purificada. Após este processo se gerou o inserto de **CDJARA**.

4.3. SUBCLONAGEM NO VETOR DE CLONAGEM E EXPRESSÃO

Realizou-se a reação de ligação do inserto **CDJARA** ao vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO, através da enzima topoisomerase I. O produto da ligação foi usado para transformar bactérias altamente competentes da linhagem TOP10 One Shot Chemically Competent *E.coli*. As bactérias recombinantes foram selecionadas por White/Blue screening em meios de LB Agar–Kanamicina 50 ug/mL e X-GAL, sem IPTG. Três colônias brancas foram selecionadas para a reação de extração do DNA plasmidial por lise alcalina. O DNA plasmidial foi submetido a análise de restrição com *Bam*HI e *Eco*RV por duas horas a 37°C e o resultado foi visualizado em um gel de agarose 1% com Brometo de Etídeo. Foram observadas três colônias transformadas com a presença do vetor pCR 2.1 TOPO, das quais duas eram recombinantes com a presença do inserto de aproximadamente 701 pb (Figura 14).

O DNA plasmidial das colônias recombinantes foi seqüenciado pelo método de nucleotídeos de terminação, obtendo-se como resultado que o Clone 3 correspondia ao **Domínio Catalítico da Jararagina**. Para este estudo se trabalho com o clone 3 denominado **CDJARA**.

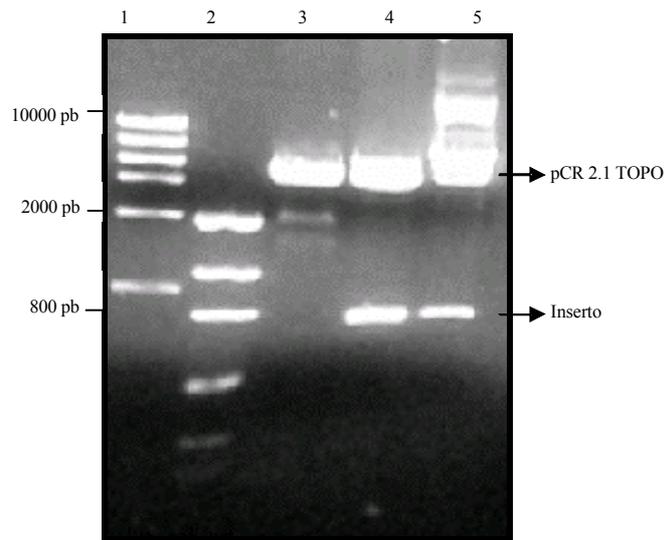


Figura 14. Análise de restrição com *Bam*HI e *Eco*RV do vetor pCR 2.1 TOPO-CDJARA extraído de colônias transformadas: 1) Marcador de massa molecular alto. 2) Marcador de massa molecular baixo. 3) Colônia 1: Não recombinante. 4) e 5) Colônia 2 e 3: Recombinantes. As setas superior e inferior indicam as bandas correspondentes ao plasmídeo e ao inserto, respectivamente.

4.4. SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO

Do clone 3 foi extraído o plasmídeo **pCR2.1-TOPO-CDJARA**. O vetor foi digerido com as enzimas *Eco*RV e *Bam*HI, para obtenção do inserto **CDJARA**. Para a reação de subclonagem no vetor de expressão pET28a, o inserto e o novo plasmídeo foram submetidos a reação de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, obtendo-se um inserto que foi observado em um gel de agarose 1% com Brometo de Etídeo, de onde foi quantificado, extraído e purificado, para a posterior reação de ligação com T4 DNA ligase.

O produto da ligação **pET28a-CDJARA**, foi utilizada para transformar células altamente competentes da linhagem de propagação *E.coli* DH5 α . Foram observadas 14 colônias transformantes no meio seletivo de LB com Kanamicina 30 μ g/mL, as quais foram submetidas a lise alcalina para extração do plasmídeo e

análise de restrição com *Xho*I e *Bam*HI. No gel de agarose foram detectadas três colônias recombinantes com o inserto de aproximadamente 722 pb (Figura 15).

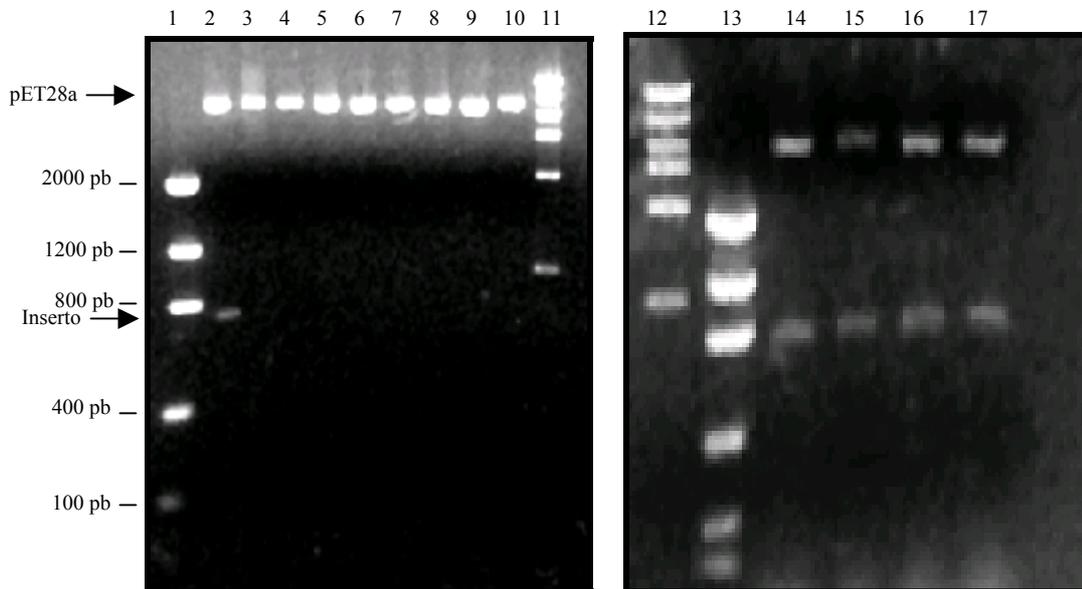


Figura 15. Análise de Restrição com *Bam*HI e *Xho*I do vetor pET28a-CDJARA extraído de colônias *E.coli* DH5 α transformadas: 1) Marcador de massa molecular baixo. 2) Colônia 1 transformada com pET28a recombinante. 3) – 10) Colônias transformadas com pET28a não recombinantes. 11) Marcador de massa molecular alto. 12) Marcador de massa molecular alto. 13) Marcador de massa molecular baixo. 14) – 17) Colônias 11–14 transformadas com pET28a recombinantes. As setas superiores e inferiores indicam as bandas correspondentes ao plasmídeo e ao inserto, respectivamente.

Para as subseqüentes análises de expressão da proteína heteróloga, se realizou uma segunda reação de transformação com o plasmídeo circular **pET28a CDJARA** em células competentes de *E. coli* da linhagem BL21(DE3). Do ensaio de transformação foram obtidas seis colônias (Figura 16). Destas colônias foi feita a extração do plasmídeo, e posterior análise de restrição com as enzimas *Xho*I e *Bam*HI, em gel de agarose 1% com Brometo de Etídeo. A presença do inserto do tamanho apropriado, confirmou que todas as colônias eram transformantes.

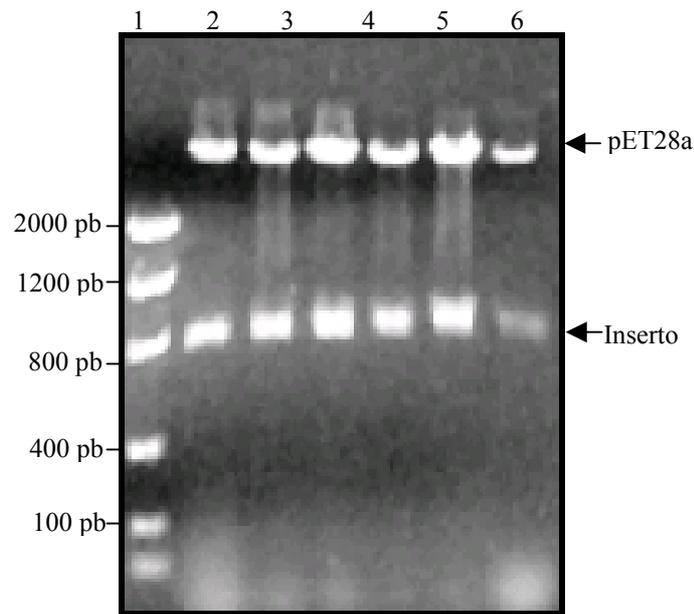


Figura 16. Análise de restrição de colônias transformantes (DE3) com pET28a–CDJARA com *Xho*I e *Bam*HI. 1) Marcador de massa molecular baixo. 2) – 7) Colônias transformantes com pET28a–CDJARA. As setas superior e inferior indicam as bandas correspondentes ao plasmídeo e ao inserto, respectivamente.

4.5. SEQÜENCIAMENTO DO INSERTO

SUBCLONADO NO VETOR DE EXPRESSÃO

A seqüência do inserto **CDJARA** e a direção de leitura, foram conferidos pelo seqüenciamento de DNA. O resultado foi submetido a análise no programa **BLAST** (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) (Altschul *et al.*, 1990). Esta ferramenta procura por similaridades locais entre duas seqüências, isto é, caso as seqüências não sejam suficientemente similares em toda sua extensão, o programa restringe o alinhamento a porção de maior valor associado. A procura é realizada através do algoritmo heurístico. Este algoritmo elimina estatisticamente homologias casuais. Como resultado do BLAST obteve-se confirmação de que a seqüência do

inserto no vetor de expressão correspondia ao domínio catalítico da Jararagina, com uma identidade de 100%.

Para verificar a ausência de mutações ou alterações na seqüência de nucleotídeos deste inserto, os dados do seqüenciamento do inserto foram alinhados com a seqüência da Jararagina. Para este propósito foi utilizada a ferramenta MultiAlin (Corpet, 1998) (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_multalin.html). Este programa utiliza a matriz BLOSUM 62 (Blocks Substitution Matrix), construída a partir de seqüências de proteínas com identidades não superiores a 62%, como padrão de substituição de resíduos. A figura 17 mostra o resultado do multialinhamento da seqüência obtida para o clone chamado **pET28a-CDJARA** com a seqüência da pró-Jararagina. Observa-se a compatibilidade de 100% entre os resíduos de nucleotídeos das duas seqüências ao nível do domínio catalítico (entre as posições 451-1117 pb) da pró-Jararagina. Esta compatibilidade é representada pela seqüência comum consenso em vermelho, confirmando a presença de um inserto correspondente à seqüência do domínio metaloprotease da Jararagina no vetor pET28a na linhagem *E.coli* BL21(DE3) pronta para ensaios de expressão e sem mutações.

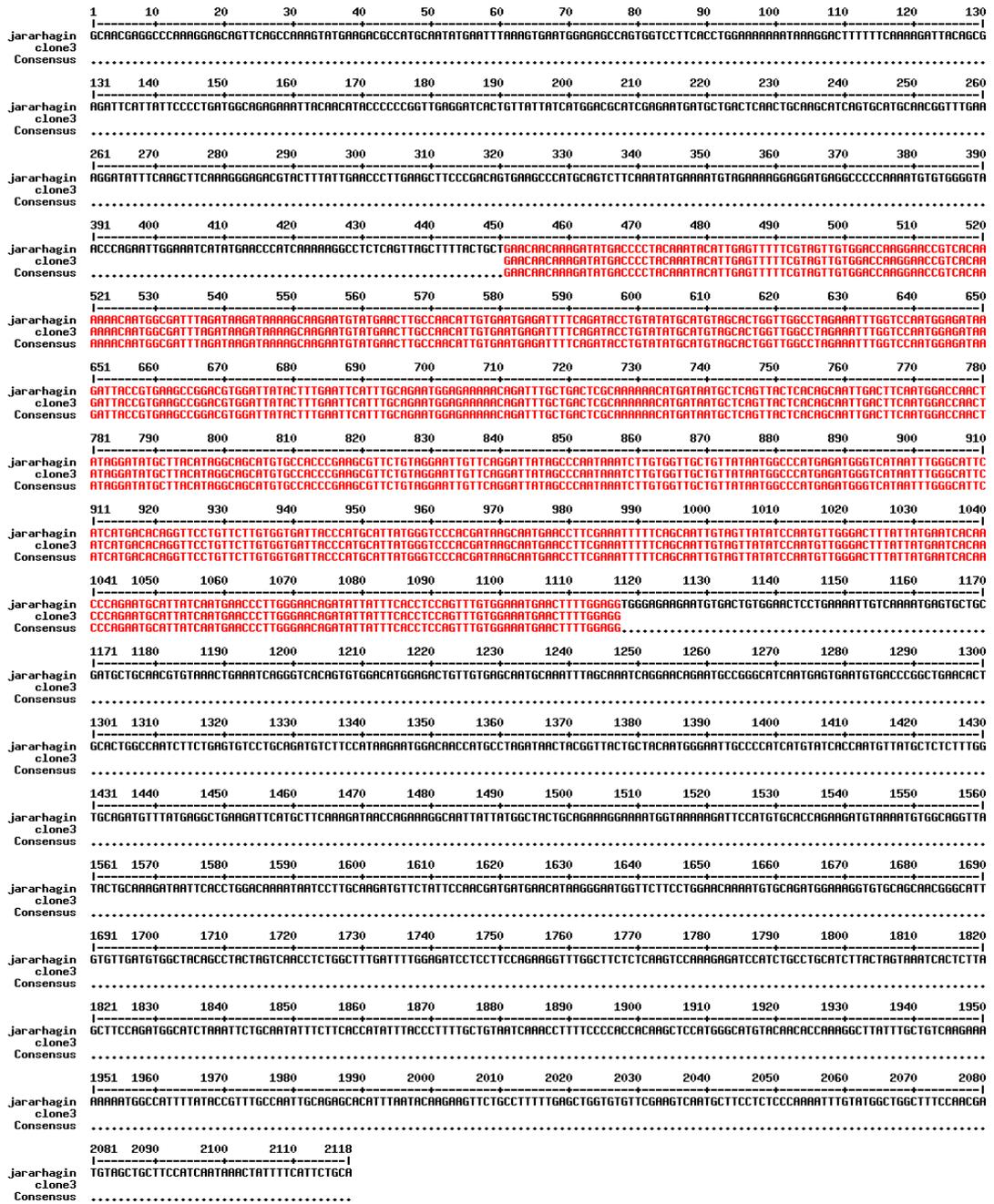


Figura 17. Multialinhamento utilizando o programa NPSA MULTIALIN. A primeira fila corresponde à seqüência de nucleotídeos da Jararagina e a segunda corresponde à seqüência de nucleotídeos obtida pelo seqüenciamento de DNA do clone pET28a-CDJARA. As letras vermelhas indicam as bases comuns entre as duas seqüências.

4.6. ENSAIOS DE EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE

Para o ensaio de expressão e solubilidade foram coletadas amostras das diferentes frações celulares que foram analisadas por SDS-PAGE 12% a 15%. Foram designadas como T₀ (Extrato celular antes da indução com IPTG), T₂ (Extrato celular após três horas de indução com IPTG 0,5 mM), S₁ (Fração solúvel), S₂ (Corpos de inclusão recuperados em uréia) e P (Corpos de inclusão no pellet). No ensaio de expressão observou-se super-produção depois da indução com IPTG (T₂) de uma proteína de aproximadamente 30 kDa compatível com a rCDJARA, a qual estava principalmente representada na forma insolúvel em corpos de inclusão, tanto na fração S₂ quanto no P, como mostrado no ensaio de solubilidade (Figura 18).

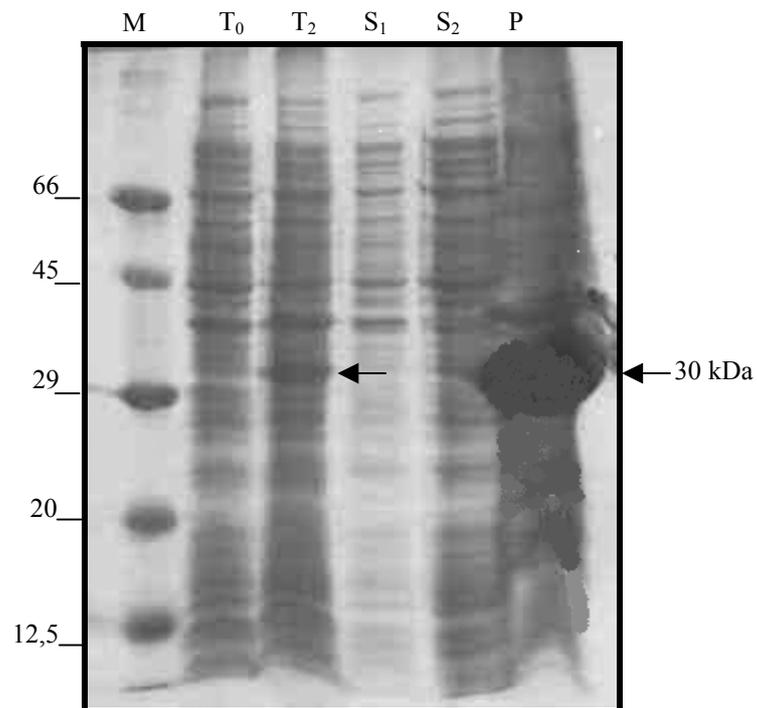


Figura 18. Ensaio de expressão e solubilidade. SDS-PAGE a 12% de amostras coletadas das diferentes frações de um ensaio de extratos celulares. M, Marcador de Massa Molecular. T₀, Extrato celular antes da indução com IPTG. T₂, Extrato celular após a indução com IPTG. S₁, Fração Solúvel. S₂, Corpos de Inclusão recuperados em Uréia. P, Corpos de Inclusão no pellet. As setas indicam a proteína recombinante (rCDJARA).

4.7. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A partir da fração coletada dos corpos de inclusão solubilizados em uréia (S_2), foi realizada a posterior purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade por metal em resina de níquel. Cerca de 50 mL de S_2 obtidos de um litro de cultura foram filtrados e passados em uma coluna de 5 mL de resina de níquel (Ni-NTA). Frações das lavagens com tampão de ligação, com tampões de lavagem e com o tampão de eluição, foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE a 12%. Nas amostras 8 e 9 da eluição, observou-se a proteína recombinante em condições de pureza adequadas para os ensaios de atividade (Figura 19).

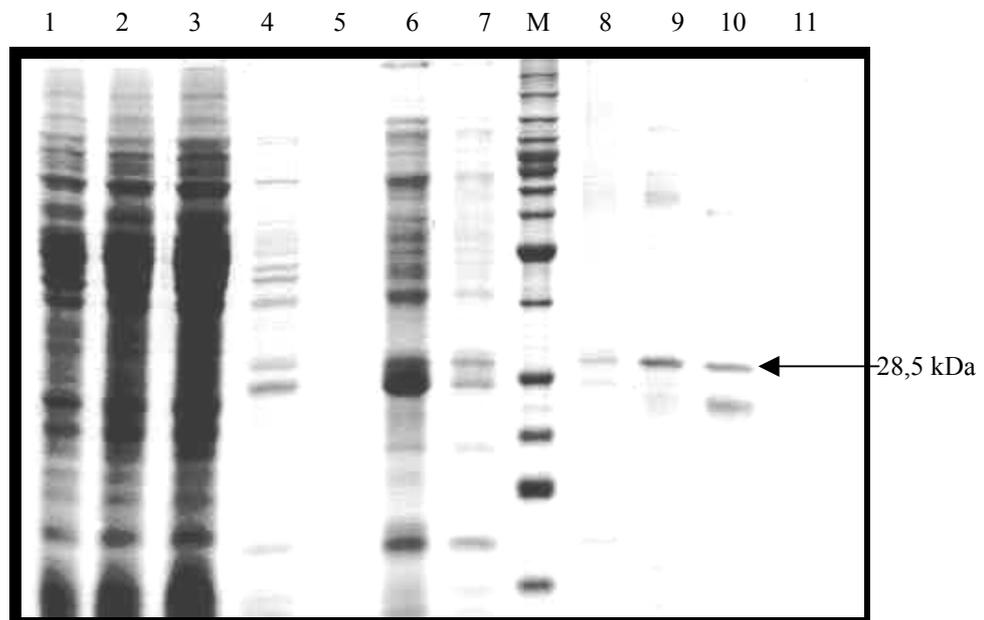


Figura 19. Purificação da rCDJARA em cromatografia de afinidade. Análise por SDS-PAGE a 12%. 1), 2) e 3) Frações do tampão de ligação. 4) e 5) Frações do tampão de lavagem com 5 mM de Imidazol. 6) e 7) Frações do tampão de lavagem com 20 mM de Imidazol. M: Marcador de Massa Molecular. 8)- 11) Frações do tampão de eluição. A seta indica a banda correspondente a rCDJARA.

4.8. ENOVELAMENTO ATRAVÉS DE DIÁLISE

A proteína em condições desnaturantes com uréia 6M, foi reduzida com um tampão de redução contendo ditioneitol (DTT) e uréia 6 M. A proteína foi re-enovelada através da remoção gradativa da uréia, para a recuperação da sua atividade. A amostra sem uréia foi concentrada por filtração sob pressão e quantificada pelo método de Bradford. Obteve-se uma concentração máxima de 0,2 mg/mL, com uma produção por litro de 1 mg. A proteína foi analisada por SDS-PAGE a 15% (Figura 20 parte A). Quando deixada a temperatura ambiente por 24 horas, a **rCDJARA** re-enovelada mostrou auto-processamento, determinado pelo desaparecimento da banda de 30 kDa e o aparecimento concomitante de uma banda típica de degradação de menor massa molecular (Figura 20 parte B).

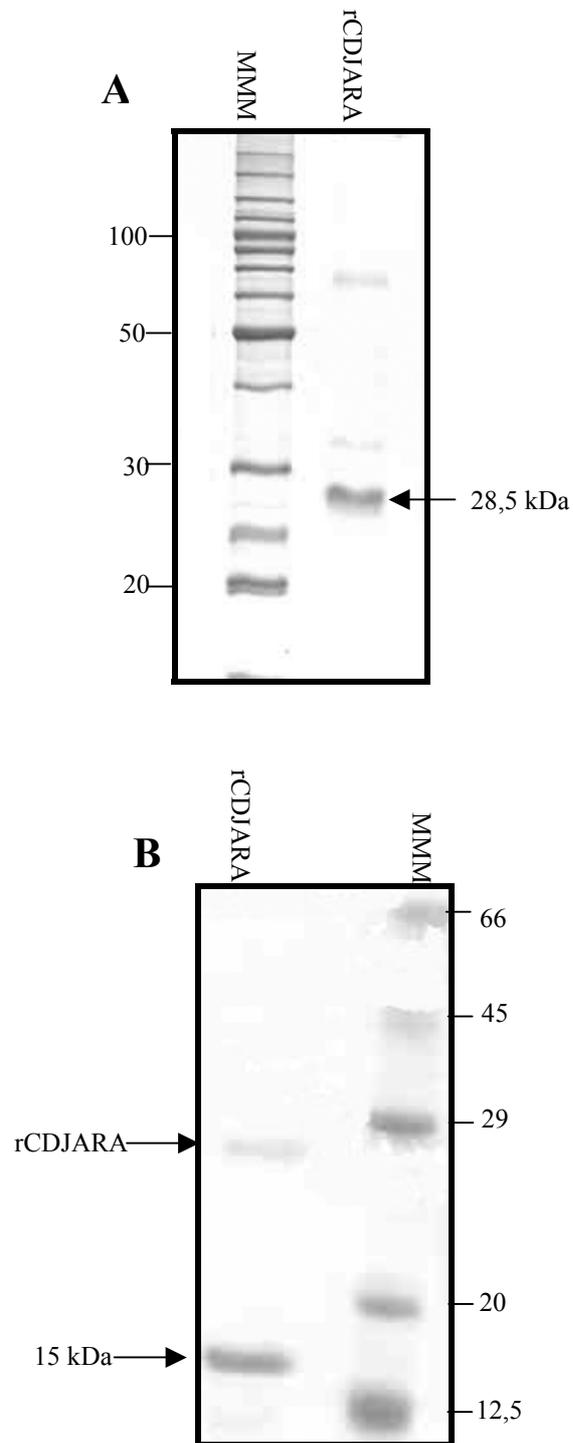


Figura 20. SDS-PAGE a 15% de amostra de rCDJARA após o envelhecimento. A seta indica a banda correspondente a rCDJARA. B rCDJARA após do envelhecimento deixada a temperatura ambiente durante 24 horas. As setas superior e inferior indicam a rCDJARA e uma banda de degradação, respectivamente.

4.9. DICROÍSMO CIRCULAR

Na Figure 21 se observa o espectro de CD obtido para a rCDJARA conmparado com os espectros obtidos para a Jararagina nativa e para a ACLH nativa e recombinante (uma svMP- PI isolada do veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus*). Os quatro espectros foram caracterizados por apresentarem dois mínimos a 209.5 e 221.0 nm, e um máximo próximo aos 195.0 nm. A rCDJARA evidenciou um espectro de CD similar ao da Jararagina e ACLH nativa e recombiante, o que indica o correto enovelamento desta proteína expressa em bactéria.

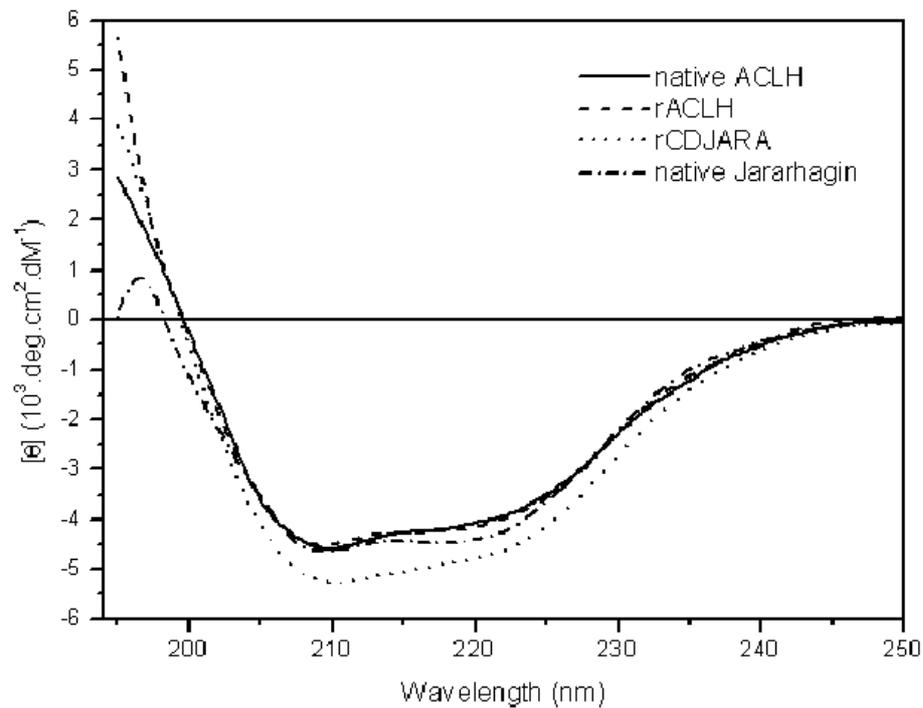


Figura 21. Comparação do espectro de Dicroísmo Circular obtido para a rCDJARA com os espectros obtidos para a proteínas nativas ACLH e Jararagina e para a ACLH recombinante. Observan-se dois mínimos a 209.5 nm e 211.0 nm e um máximo a aprox. 195.0 nm.

4.10. IMUNODETECÇÃO

A proteína recombinante, enovelada, foi reconhecida pelo anticorpo policlonal de coelho contra a Jararagina nativa (Figura 22) e revelada com substratos cromogênicos, visualizando-se uma banda típica de 28,5 kDa, correspondente à rCDJARA.

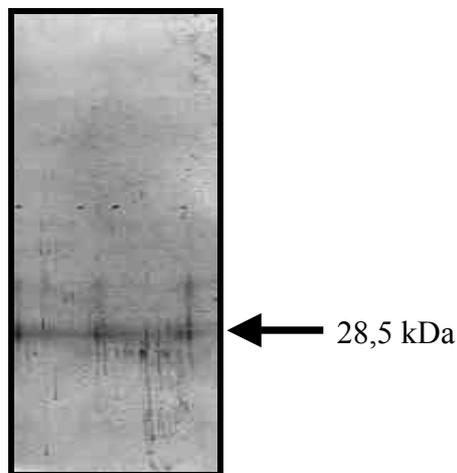


Figura 22. Imunodeteção da rCDJARA com anticorpo policlonal de coelho anti-jararagina (1:5000), revelado com agentes cromogênicos. A seta indica a banda correspondente a rCDJARA.

4.11. ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA

A rCDJARA e o fibrinogênio foram colocados na reação em uma proporção de 1:30, respectivamente. Foi observada a degradação parcial da cadeia alfa do fibrinogênio após 4 horas de incubação a 37°C. Após 24 horas, foi observada a degradação total da cadeia alfa e da cadeia beta do fibrinogênio (Figura 23 parte A). A atividade fibrinogenolítica da Jararagina nativa foi testada nas mesmas condições, observando-se degradação parcial da cadeia alfa e beta na primeira hora da reação (Figura 23 parte B).

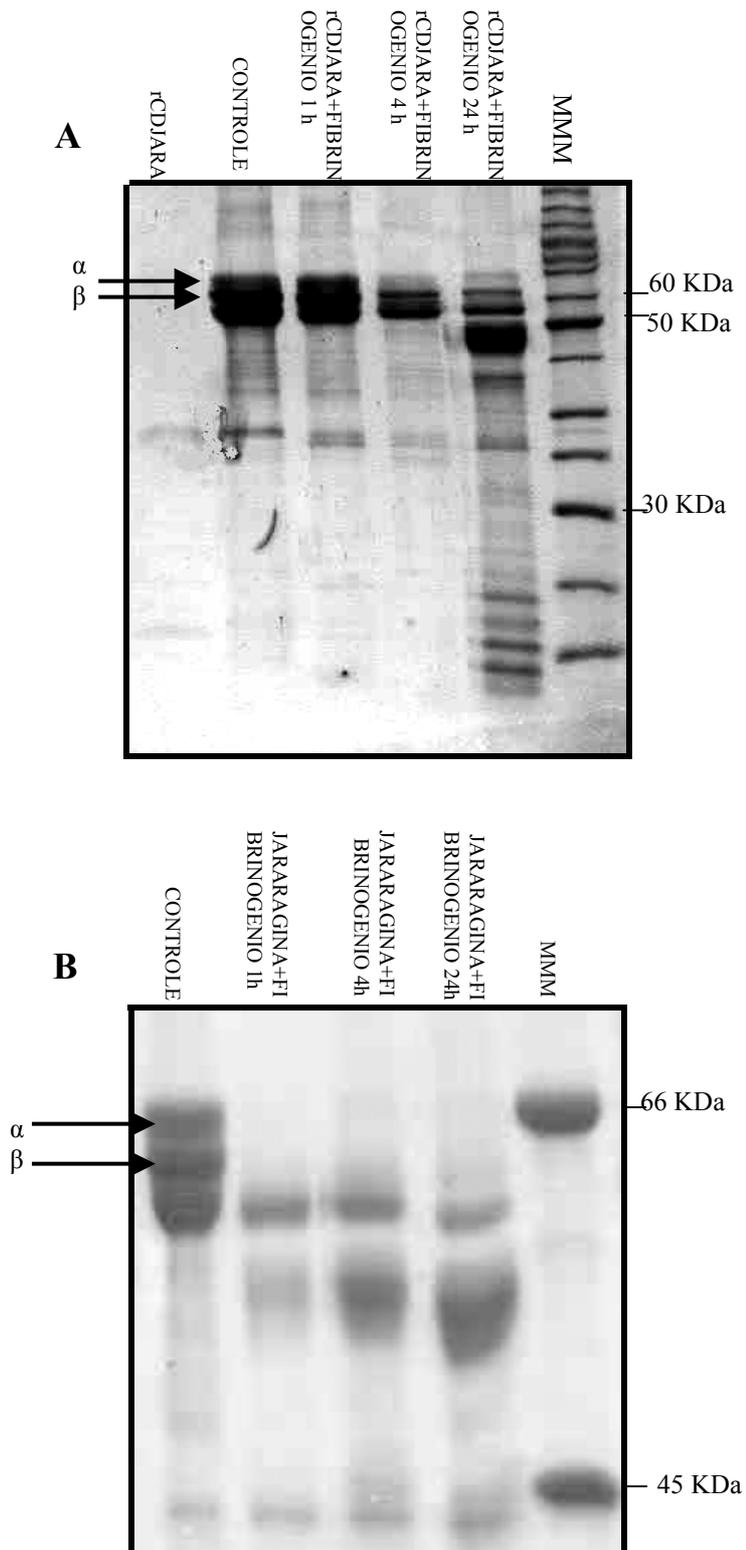


Figura 23. Atividade Fibrinogenolítica da Jararagina recombinante (A, rCDJARA) e nativa (B). Proporção enzima: substrato 1:30. Ambos os testes foram incubados a 37°C. As setas superiores e inferiores indicam as cadeias α e β do fibrinogênio, respectivamente.

4.12. ATIVIDADE SOBRE FIBRONECTINA

A atividade da **rCDJARA** foi investigada sobre o substrato da matriz extracelular, fibronectina. A **rCDJARA** foi incubada a 37°C com a fibronectina humana (HFN) em uma proporção de 1: 40. Após 24 h de incubação a 37°C, **rCDJARA** degradou a subunidade maior da fibronectina (Figura 24 parte A). A mesma reação foi montada usando como enzima a Jararagina nativa, nas mesmas condições. A proteína nativa degradou a subunidade maior da HFN após duas hora de reação (Figura 24 parte B).

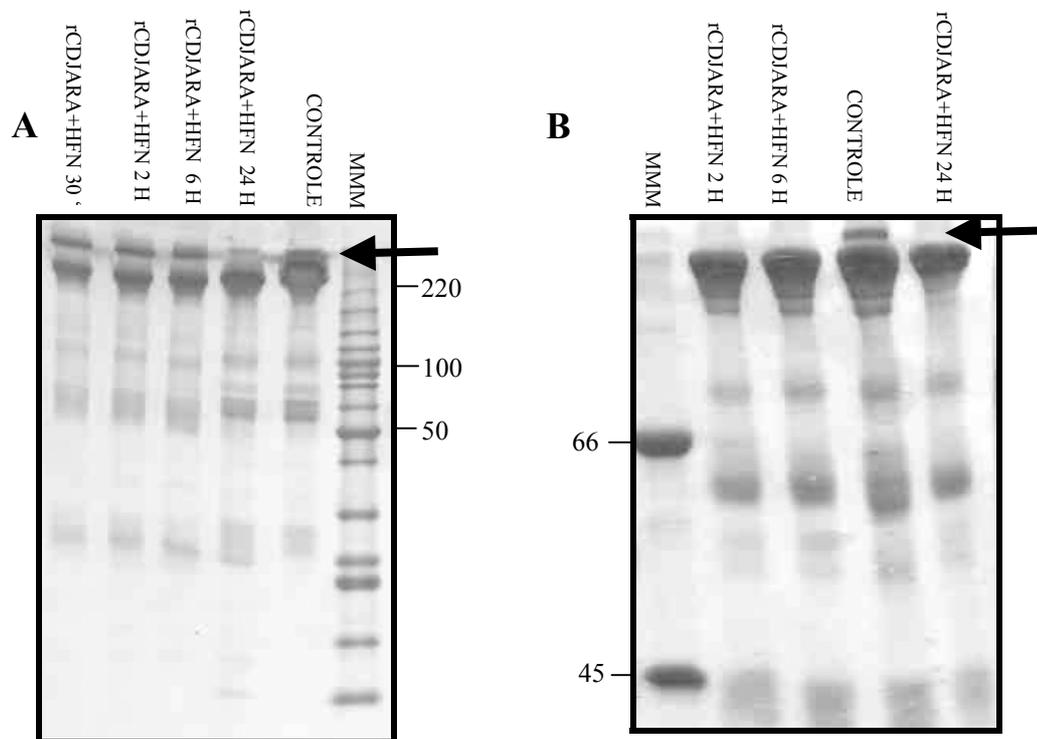


Figura 24. Atividade proteolítica sobre fibronectina humana (HFN) com proporção enzima: substrato 1:40. A- Ensaio com rCDJARA . B- Ensaio da Jararagina nativa. Nos dois casos as amostras foram incubadas a 37 °C. As setas indicam a subunidade maior da HFN.

4.13. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE COLÁGENO I

O teste da atividade proteolítica da **rCDJARA** sobre colágeno tipo I foi realizado utilizando uma proporção enzima – substrato de 1:60, respectivamente. A atividade colagenolítica da Jararagina nativa foi testada nas mesmas condições. Após 24 h de incubação a 37°C, nem a proteína heteróloga, nem a proteína nativa, degradaram este substrato da matriz extracelular (Figura 25 partes A e B) .

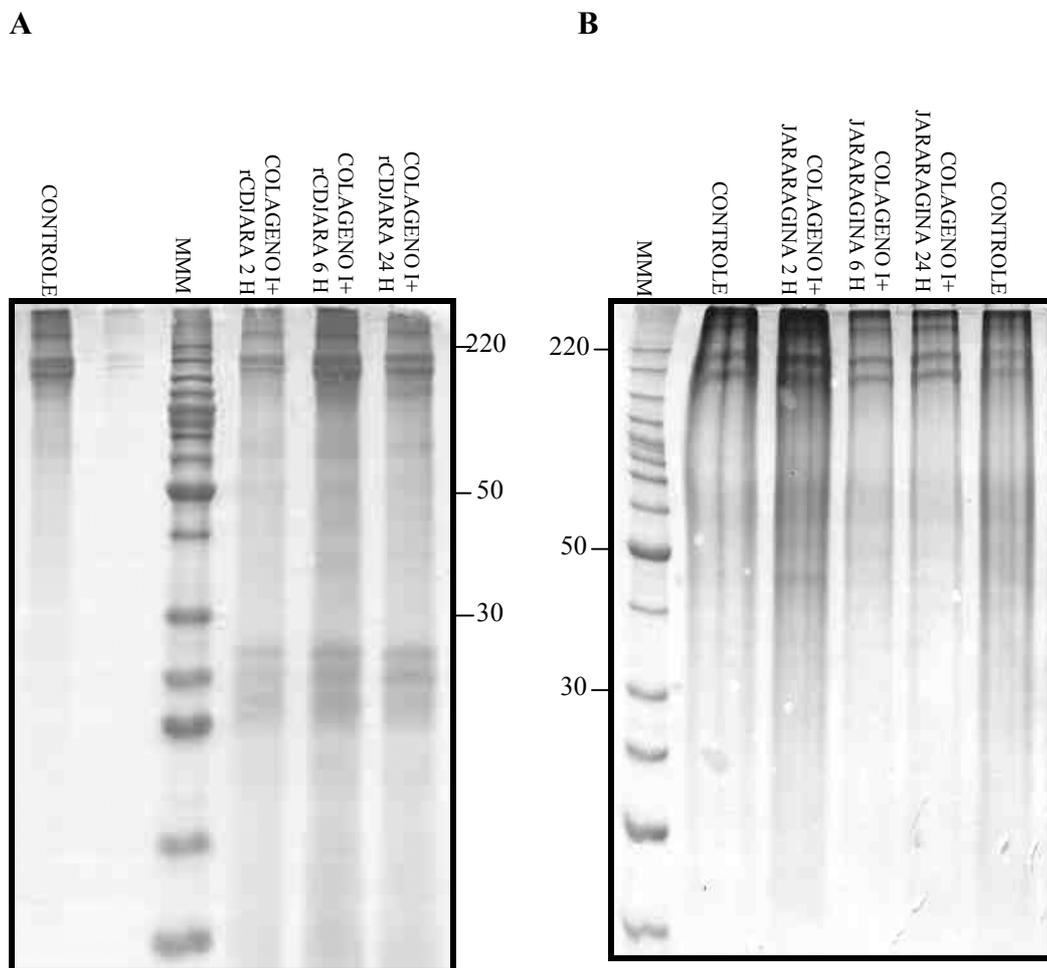


Figura 25. Atividade proteolítica da sobre Colágeno tipo I com proporção enzima: substrato 1:60. A- Ensaio com rCDJARA. B- Ensaio com a Jararagina nativa.

4.14. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE COLÁGENO IV

A atividade da **rCDJARA** foi investigada sobre Colágeno tipo IV. Nesta reação a proporção utilizada foi de 1:80. Após 24 h de incubação a 37°C, a **rCDJARA** não degradou este substrato da matriz extracelular (Figura 26 A).

A atividade proteolítica da Jararagina nativa sobre Colágeno tipo IV foi realizada seguindo as mesmas condições de reação da **rCDJARA**. Após 24 horas de incubação, observou-se o desaparecimento de algumas bandas de alto peso molecular com a correspondente aparecimento de bandas de degradação de baixo peso (Figura 26B).

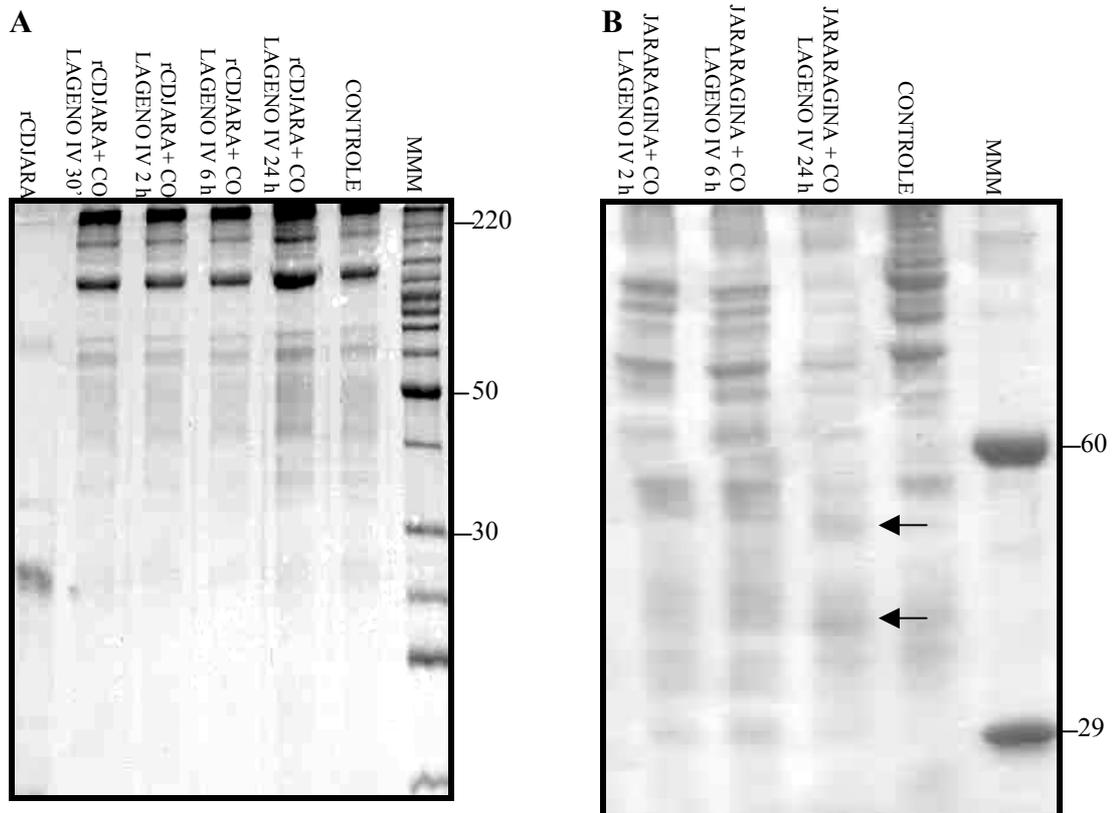


Figura 26. Atividade proteolítica sobre Colágeno tipo IV . A- rCDJARA com proporção enzima: substrato 1:54. B- Jararagina nativa com proporção enzima substrato 1:54. As setas indicam as bandas de degradação.

4.15. DEGLICOSILAÇÃO ENZIMÁTICA

Como mostra a Figura 27, a Jararagina nativa (originalmente glicosilada) e deglicosilada com PNGase F, demonstraram diversidade na sua mobilidade eletroforética no SDS-PAGE. Esta variação foi de aproximadamente 10% na massa molecular e indica a contribuição dos motivos de carboidratos na massa molecular total da proteína.

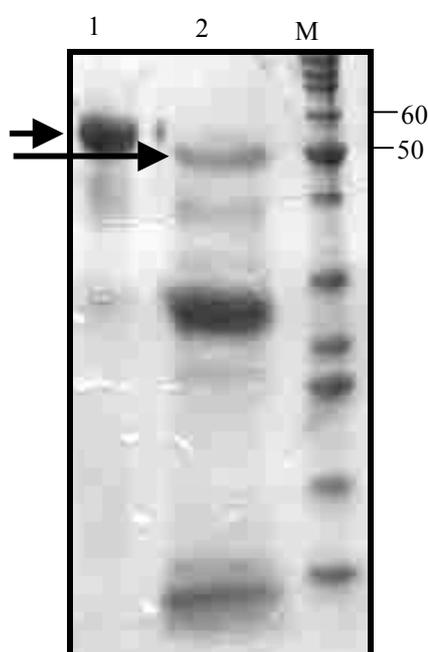


Figura 27. Alteração na mobilidade eletroforética da Jararagina causada pela deglicosilação. 1) Jararagina nativa. 2) Jararagina nativa tratada com PNGase F. M) Marcador de massa molecular. As setas superior e inferior indicam a proteína glicosilada e deglicosilada, respectivamente.

4.16. PARÂMETROS CINÉTICOS

A atividade proteolítica da proteína recombinante re-enovelada sobre um peptídeo de fluorescência apagada, foi testada. Foi analisado um peptídeo contendo o fluoróforo N-terminal o-aminobenzoil (Abz) e no C-terminal o apagador N-(2,4-

dinitrofenil)-etilenodiamino (EDDnp) com seqüências relacionadas com a cadeia B da insulina. O substrato Abz-LVEALYQ-EDDnp (10 μg) foi hidrolisado pela rCDJARA (0.05 μg) e pela jararagina nativa (0.16 μg) obtendo-se os seguintes parâmetros cinéticos (Tabela 2):

Tabela 2. Parâmetros cinéticos das enzimas recombinante e nativa para a hidrólise do substrato de fluorescência apagada Abz-LVEALYQ-EDDnp.

Protein	Kinetic Parameters		
	K_m Mm	k_{cat} s^{-1}	k_{cat}/K_m $mM^{-1}s^{-1}$
Jararagina Nativa	5.08	0.093	18.2
Jararagina Nativa Deglicosilada	7.76	0.14	17.8
rCDJARA	29.7	0.0105	0.35
ACLH Nativa	12.57	0.28	23
ACLH Nativa Deglicosilada	10.63	0.23	21.3
rACLH	19.5	0.0071	0.38

A Figura 28 apresenta os gráficos obtidos para a rCDJARA, com os valores de Velocidade em UAF/min pela concentração de substrato em μM (Figura 28 A) e valores (1/Velocidade) sobre (1/[Substrato]) (Figura 28 B). UAF é uma unidade arbitrária de fluorescência determinada por parâmetros específicos do equipamento de medição.

A Figura 29 apresenta os gráficos obtidos para a Jararagina nativa, com os valores de Velocidade em UAF/min pela concentração de substrato em μM (Figura 29 A) e valores (1/Velocidade) sobre (1/[Substrato]) (Figura 29 B).

A Figura 30 apresenta os gráficos obtidos para a Jararagina nativa deglicosilada, com os valores de Velocidade em UAF/min pela concentração de substrato em μM (Figura 30 A) e valores (1/Velocidade) sobre (1/[Substrato]) (Figura 30 B).

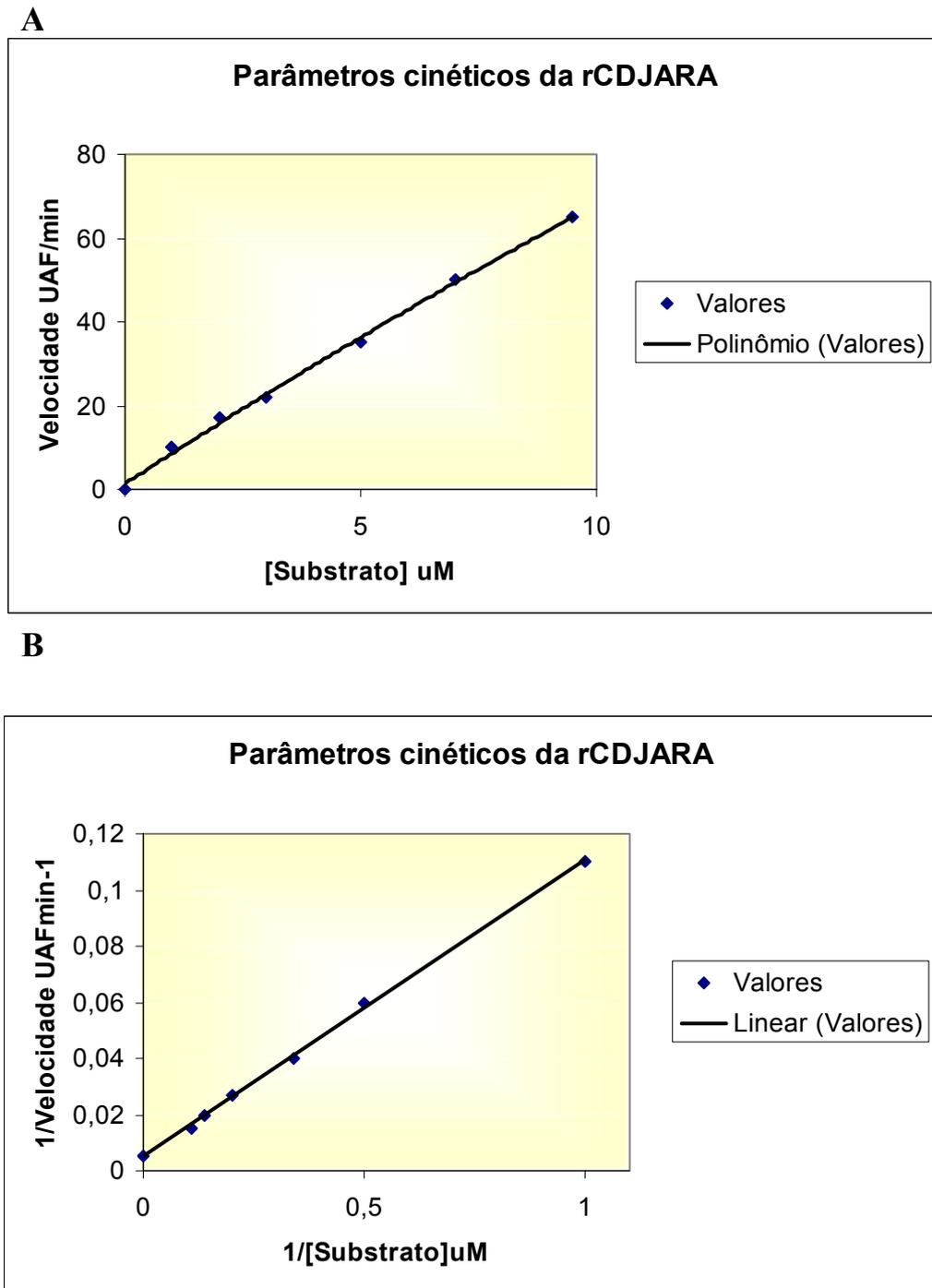


Figura 28. Parâmetros cinéticos da rCDJARA. A- Gráfico representando Velocidade/[Substrato]. B- Gráfico representando de $(1/\text{Velocidade}) / (1/[\text{Substrato}])$.

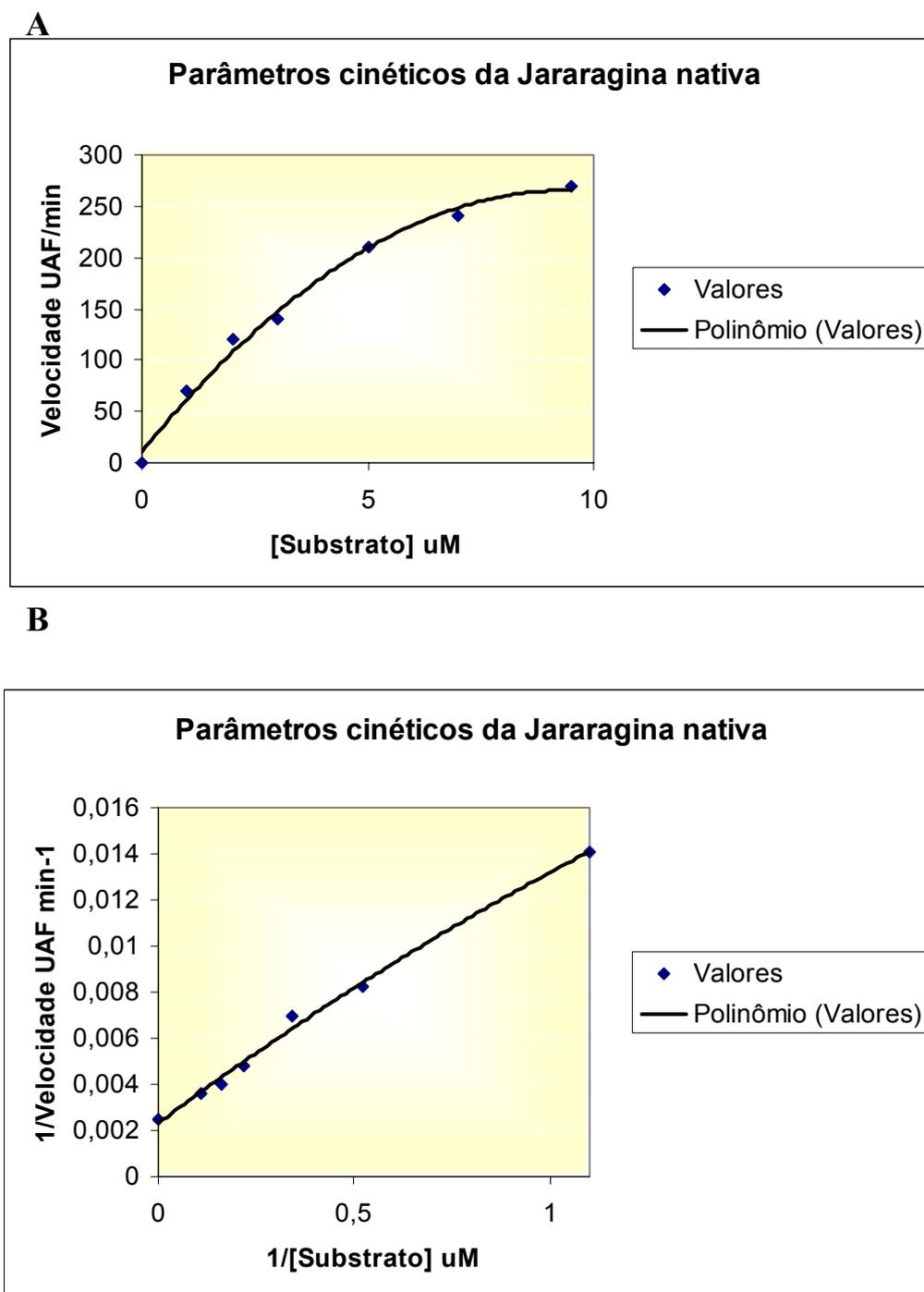
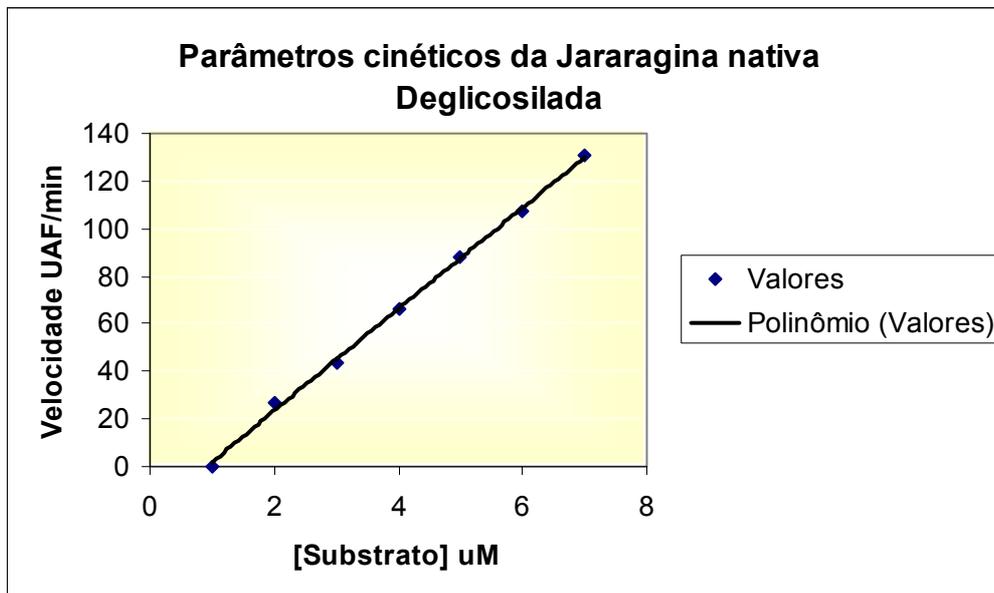


Figura 29. Parâmetros cinéticos da jararagina nativa. A- Gráfico representando Velocidade/[Substrato]. B- Gráfico representando $(1/\text{Velocidade}) / (1/[\text{Substrato}])$.

A



B

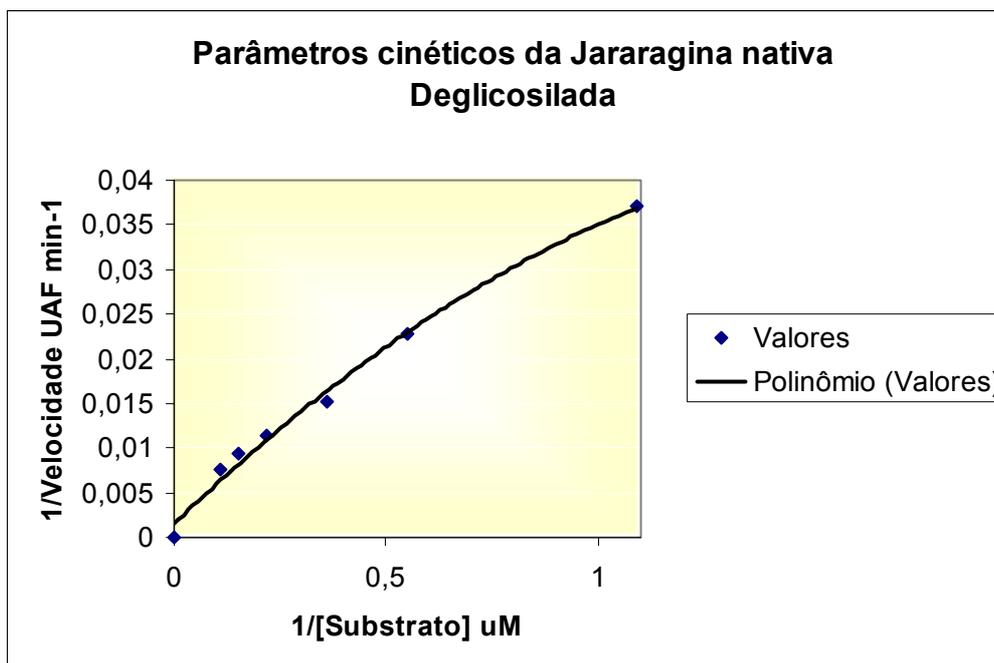


Figura 30. Parâmetros cinéticos da jararagina nativa deglicosilada. A- Gráfico representando Velocidade/[Substrato]. B- Gráfico representando $(1/\text{Velocidade}) / (1/[\text{Substrato}])$.

Observa-se que o K_m da enzima recombinante é 5 vezes maior que o da proteína nativa, e também que a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) da primeira foi

aproximadamente 50 vezes menor, indicando que a rCDJARA e a Jararagina nativa apresentam significativas diferenças na sua afinidade pelo substrato e na sua eficiência para clivá-lo.

Adicionalmente, a atividade proteolítica da Jararagina nativa deglicosilada, foi testada sobre fibrinogênio e fibronectina, sem nenhuma diferença evidente com a atividade demonstrada pela Jararagina nativa não modificada *in vitro*.

4.17. ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Doses entre 15-150 μg da proteína heteróloga foram aplicadas intradermicamente em camundongos albinos. A rCDJARA não mostrou atividade hemorrágica em nenhuma das doses aplicadas (Figura 31).

No caso da jararagina nativa, doses de 5 μg da proteína nativa ou deglicosilada foram injetadas (Figura 32). A jararagina tratada com PNGase F não mostrou nenhuma atividade hemorrágica, resultado contrário ao observado com a Jararagina não tratada que causou uma lesão hemorrágica de 2 cm^2 (Figura 32). Adicionalmente foi testada a atividade hemorrágica da jararagina nativa, após 24 horas de incubação a 37°C. Este teste foi considerado um controle da deglicosilação e foi montado com 5 μg da Jararagina nativa nas mesmas condições de reação, mas, sem a adição da PNGase F. A Jararagina nativa controle causou uma mancha hemorrágica de 1 cm^2 , correspondente a 50% da atividade demonstrada para a Jararagina nativa (Figura 33).



Figura 31. Ausência de Atividade Hemorrágica da rCDJARA sobre pele de camundongos albinos. As setas indicam os sítios de injeção.

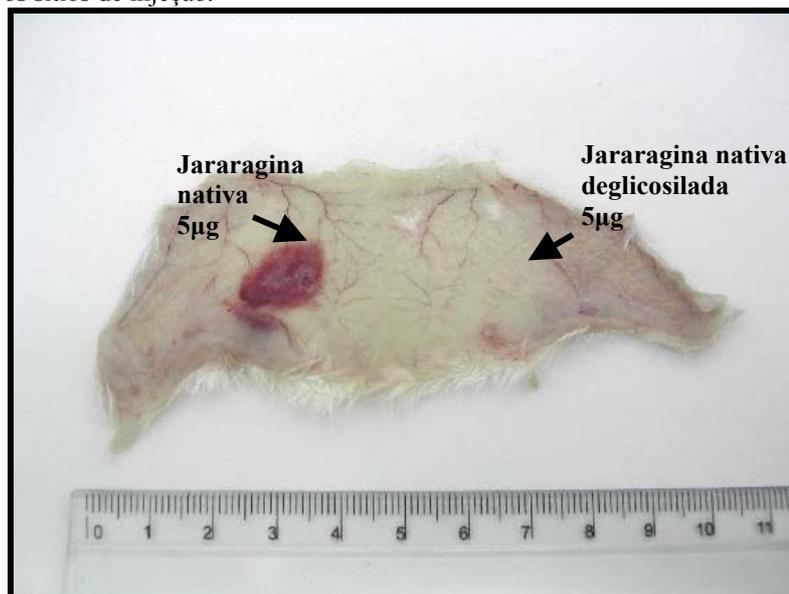


Figura 32. Atividade Hemorrágica da Jararagina nativa sobre pele de camundongos albinos. As setas indicam os sítios de injeção.

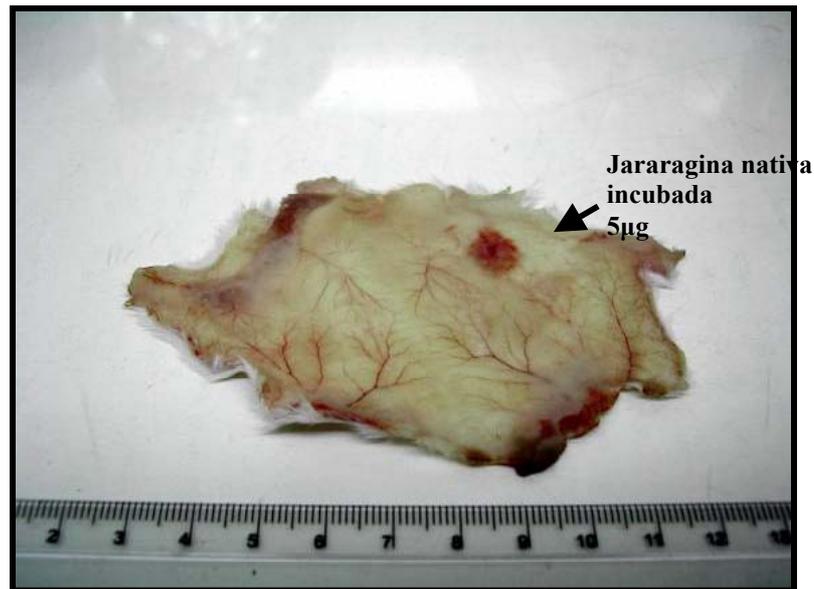


Figura 33. Atividade Hemorrágica da jararagina nativa após 24 horas de incubação a 37°C. A seta indica o sítio de injeção.

4.18. ZIMOGRAFIA

A atividade proteinase da **rCDJARA** e da Jararagina nativa sobre gelatina foi testada. Nos géis de zimografia após 24 de incubação se evidenciou o aparecimento de bandas claras de degradação (Figura 34).



Figura 34. Atividade proteinase sobre géis de gelatina. 1) Jararagina nativa (52 kDa). 2) rCDJARA (28,5 kDa). As setas superior e inferior indicam as bandas claras de degradação do substrato da proteína nativa e recombinante, respectivamente.

4.19. PARÂMETROS TEÓRICOS

4.19.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os parâmetros físico-químicos da **rCDJARA** foram determinados utilizando o programa **PROT PARAM TOOL** (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>). Os resultados obtidos foram os seguintes:

- **Número de aminoácidos:** 257
- **Peso Molecular:** 28773.6
- **pI Teórico:** 5.88
- **Número Total de resíduos negativamente carregados:** 28
- **Número Total de resíduos positivamente carregados:** 19

- **Composição atômica:**

Carbono (C)	1267
Hidrogênio (H)	1947
Nitrogênio (N)	349
Oxigênio (O)	381
Enxofre (S)	19
- **Fórmula:** C₁₂₆₇H₁₉₄₇N₃₄₉O₃₈₁S₁₉
- **Número Total de átomos:** 3963

A composição de aminoácidos da **rCDJARA** obtida com auxílio do programa Prot Param Tool é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição de aminoácidos da proteína rCDJARA (Prot Param Tool).

Composição de aminoácidos da rCDJARA		
Resíduo	Número	Porcentagem (%)
Ala (A)	10	3.9
Arg (R)	8	3.1
Asn (N)	16	6.2
Asp (D)	15	5.8
Cis (C)	8	3.1
Gln (G)	8	3.1
Glu (E)	13	5.1
Gli (G)	22	8.6
His (H)	15	5.8
Ile (I)	21	8.2
Leu (L)	16	6.2
Lis (K)	11	4.3
Met (M)	11	4.3
Fen (F)	7	2.7
Pro (P)	13	5.1
Ser (S)	19	7.4
Tre (T)	12	4.7
Trp (W)	3	1.2
Tir (Y)	12	4.7
Val (V)	17	6.6

4.19.2. MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

Os sítios de processamento pós-traducionais foram determinados utilizando a ferramenta SCAN PROSITE (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Motivos funcionais na rCDJARA. A em umeração refere-se a posição do motivo na proteína. Segundo o programa PROSITE

Motivos Funcionais na rCDJARA		
Motivo	Seqüência	Posição
Asn-Glicosilação	NCSY	217-220
Fosforilação PKC	TYK TRK	103-105 125-127
Fosforilação CK2	SNGD SFAE TAID SCGD	97-100 114-117 136-139 195-198
Fosforilação TirK	RGS-EQQR	32-39
N-Miristoilação	GSHMAS GQQMGR GSCSCG	18-23 27-32 192-197
Ligação ao Zinco	HEMGHNLGIHHD	179-190
Poli-histidina	HHHHHH	5-10

4.19.3 MULTIALINHAMENTOS

Para análises de seqüências e alinhamentos foi utilizado o programa MULTIALIN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_multalin.html). Foi feito um multialinhamento das seqüências do domínio metaloprotease de varias svMPs hemorrágicas, para determinar possíveis motivos comuns de glicosilação. Foram alinhadas as seqüências (na seguinte ordem de cima para baixo, na Figura 35): Jararagina (*P-III*) (Paine *et al.*, 1992), HR1B (*P-III*) (Kishimoto e Takahashi, 2002), Rodostoxina(*P-III*) (Ponnudurai *et al.*, 1993) e ACLH (*P-I*) (Selistre-de-Araújo e Ownby, 1995). Foi encontrado um sitio comum de glicosilação, **NCSY/K**, na posição C-terminal do domínio metaloprotease de todas as seqüências analisadas.

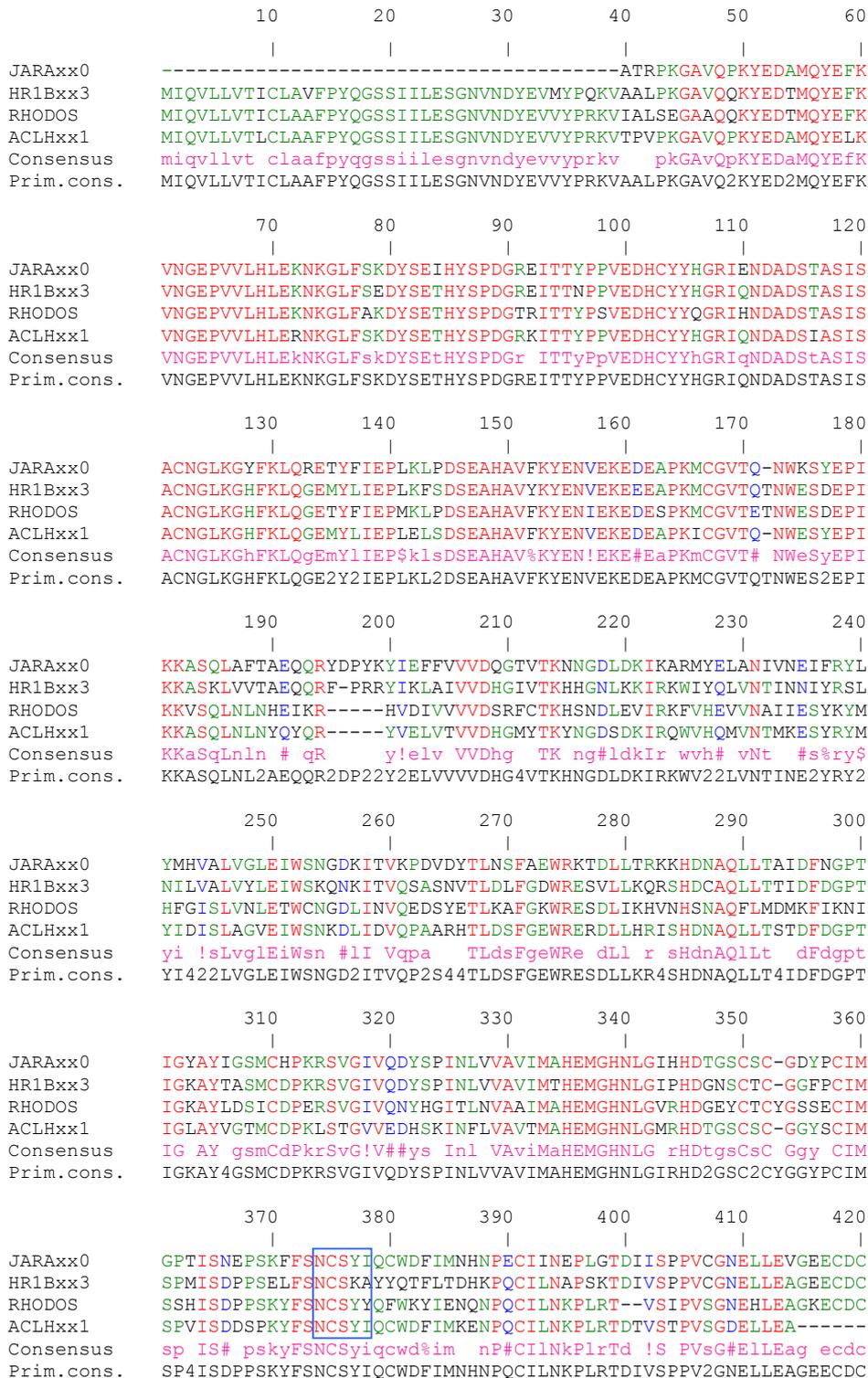


Figura 35. Alinhamento de seqüências de aminoácidos de svMPs hemorrágicas: Jararagina, HR1B, Rodostoxina e ACLH. No quadro o motivo de glicosilação comum. Em vermelho resíduos com 100% de identidade. Em azul resíduos com mais de 50% de identidade. Em verde posições com substituições conservativas.

5. DISCUSSÃO

O complexo de Golgi serve como sítio principal da célula para modificações de proteínas e lipídeos. Após o passo inicial de biossíntese no retículo endoplasmático do oligossacarídeo N-ligado, as glicoproteínas são transportadas para o complexo de Golgi, aonde são progressiva e seqüencialmente modificadas por uma serie de glicosiltransferases que residem em diferentes cisternas do complexo de Golgi (Dunphy, *et al.*, 1985). A estrutura do núcleo do oligossacarídeo, formado no retículo endoplasmático, é muito conservada, enquanto que as modificações terminais que acontecem no complexo de Golgi variam amplamente entre proteínas dentro de um determinado organismo (Varki, 1993).

Passou-se um século desde que Camilo Golgi descobriu um novo componente da célula que agora tem o seu nome. Desde então, múltiplos estudos examinando a estrutura e função desta organela estabeleceram seu papel central na glicosilação. Apesar do fato de que esta função é uma modificação essencial que acontece em todos os eucariontes, a precisa função dos oligossacarídeos continua sendo um enigma.

A glicosilação é a mais abundante e diversa modificação pós-traducional descrita (Kornfeld and Kornfeld, 1985; Hart, 1992). Os agregados glicanos podem afetar as propriedades físicas das proteínas e suas interações moleculares. Tem sido descritos funções para a glicosilação, tais como, o enovelamento protéico no retículo endoplasmático, transporte e secreção, ancoragem de proteínas e proteção contra a

proteólise. Adicionalmente, os glicanos tem um papel estrutural direto, afetando a estrutura terciária ou quaternária das proteínas. Além disso, a apresentação dos açúcares sobre as glicoproteínas pode ter um importante papel na modulação da organização da superfície celular (Wormald e Dwek, 1999), agindo como determinantes de antigenicidade e como sítios de reconhecimento biológico (interações célula-célula, hospedeiro-patógeno, hormônio-receptor, célula-matriz extracelular) (Sharon e Lis, 1993; Gahmberg e Toluane, 1996).

O presente trabalho descreve basicamente a subclonagem, expressão em bactéria, purificação, re-enovelamento com sucesso e ensaios de atividade do domínio catalítico da Jararagina, uma metaloprotease da classe *P-III* isolada do veneno de *Bothrops jararaca*. O objetivo principal deste trabalho foi determinar o papel desempenhado pelas modificações pós-traducionais na atividade proteolítica e hemorrágica desta **svMP**. Para tal fim, o domínio metaloprotease desta hemorragina foi expresso na sua forma não zimogênio, evitando-se assim, a interferência dos domínios desintegrina/rico em cisteínas sobre o efeito hemorrágico e obviando-se subseqüentes etapas de ativação.

A expressão de proteínas heterólogas em *Escherichia coli* foi o primeiro sistema de expressão. Este sistema é ideal para produção maciça de proteínas e é um método rápido e de alta eficiência, que permite a identificação da proteína recombinante através de um simples SDS-PAGE. Oferece também algumas desvantagens. Entre os inconvenientes que pode acarretar este método se encontram: a freqüente produção de proteínas inativas ou insolúveis, que requerem posterior re-enovelamento, impedindo que este método possa ser utilizado para a expressão de proteínas de genes novos ou de função desconhecida. Adicionalmente, este método

oferece problemas para proteínas com muitas pontes dissulfeto, nas quais o re-novelamento é extremamente difícil (Futami, *et al.*, 2000). Outra dificuldade, é que as proteínas expressas em *E.coli*, geralmente tem uma meia vida relativamente curta e usualmente as preparações são contaminadas com alta concentração de endotoxinas, requerendo processos cuidadosos de remoção.

O sistema de expressão em bactéria é caracterizado pela falta de modificações pós-traducionais, tais como, a glicosilação. Esta característica permite o uso deste sistema para estudar a relevância destas modificações na atividade de diversas proteínas heterólogas. No nosso caso, este sistema foi utilizado para estudar a influência da falta de glicosilação nas funções proteolítica e hemorrágica da Jararagina.

O domínio catalítico da Jararagina (**rCDJARA**) foi eficientemente expresso em *Escherichia coli*, na linhagem BL21 (DE3). A proteína heteróloga foi produzida, inicialmente, na forma insolúvel em corpos de inclusão. Estes agregados protéicos insolúveis geralmente acontecem devido à elevada concentração de proteínas heterólogas no citoplasma bacteriano, o que favorece interações eletrostáticas ou/e hidrofóbicas intermoleculares, principalmente entre proteínas globulares contendo pontes dissulfeto (Futami *et al.*, 2000). A formação destes agregados protéicos era previsível, devido à presença de três pontes dissulfeto na proteína recombinante. Geralmente, a formação de corpos de inclusão constitui um problema típico da superexpressão, já que, a obtenção das proteínas é feita em forma inativa, o que implica um passo posterior de re-novelamento *in vitro*. Mas, neste caso, foram consideradas as vantagens oferecidas por esta forma de expressão, uma delas, que os corpos de inclusão constituem uma fonte relativamente pura da proteína

recombinante, representando quase que 50% da proteína total expressa pela bactéria. Além disso, outras vantagens (pET system manual) como a facilidade de trabalho em condições desnaturantes, proteção da proteína contra o ataque proteolítico, expressão de proteínas tóxicas, assim como, o alto rendimento na produção protéica, fizeram da expressão nestas condições, uma opção válida para ser trabalhada com esta proteína. Adicionalmente, baixas condições cinéticas de expressão, como, temperaturas menores com baixas concentrações de agente indutor e tempos de expressão maiores, foram testados, sem se apresentar melhoras evidentes na solubilidade protéica.

Inicialmente, o inserto correspondendo ao domínio catalítico da Jararagina foi amplificado a partir do DNA do vetor PEZZ18 com a Jararagina completa. Esta amplificação foi feita pela técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores especificamente desenhados a partir da seqüência que delimita o domínio metaloprotease desta **svMP**. A amplificação por PCR gerou uma única banda no gel de agarose do tamanho esperado (~690 pb), que foi chamado de inserto **CDJARA**. O produto desta reação foi imediatamente utilizado para ligação no vetor pCR 2.1 TOPO, um plasmídeo ideal para clonagem e reações posteriores de subclonagem em outros vetores. Na reação de ligação entre o inserto e o vetor TOPO, foram escolhidas as condições de clonagem mais estridentes, com um tempo de ligação de apenas cinco minutos e adição de sal (Cloreto de Sódio 200 mM e Cloreto de Magnésio 10 mM), com a finalidade de obter o máximo número de recombinantes no menor número de colônias possíveis. Após a transformação foram obtidas três colônias, das quais duas eram recombinantes com um inserto de ~700 pb. Para descartar possíveis erros na amplificação ou mutações, assim como erros na ligação do inserto (direção de leitura, etc), foi feito o seqüenciamento do DNA dos

plasmídios das duas colônias recombinantes. As seqüências de DNA resultantes indicaram que somente uma das duas colônias possuía inserto de interesse (**CDJARA**) sem mutações ou erros de leitura aparentes.

Na etapa da subclonagem no vetor de expressão pET28a, a proporção molar inserto: vetor foi crítica, sendo a condição ideal a proporção 4:1. Finalmente, células BL21 (DE3), foram transformadas com a construção **pET28a-CDJARA**. Esta linhagem é ideal para os ensaios de expressão da proteína heteróloga, já que, é deficiente de algumas proteases (*LonI* e *OmpT*) e possui o gene para a T7 RNA polimerase o que junto com o vetor pET28a (com o promotor T7 e um motivo de polihistidina), constituem um sistema ideal para a superexpressão de proteínas recombinantes.

Como descrito anteriormente a **rCDJARA**, foi expressa em corpos de inclusão. Para a extração da **rCDJARA** dos corpos de inclusão foi utilizado um tampão de ligação, com altas concentrações de uréia, como agente desnaturante. O processo de purificação, em condições desnaturantes, foi feito através da técnica de cromatografia de afinidade. Esta técnica oferece o potencial de purificar, em um simples passo e com alto grau de purificação, a proteína alvo desde misturas aonde ela se encontra em baixo título. A cromatografia de afinidade utilizada foi uma matriz de nitroacetato-niquel que liga mono-especificamente moléculas de polihistidina (6His-Tag). Estes resíduos de histidina são encontrados no N-terminal no peptídeo de fusão da **rCDJARA**. Para garantir que as ligações entre o metal e o ligante fossem o suficientemente fortes para suportar as condições estridentes de lavagem, a coluna foi inicialmente equilibrada com um tampão de ligação que oferecia as condições de pH e força iônica ideais. Para maximizar a adsorção da

proteína de fusão à coluna de níquel, a mistura foi passada através da matriz com baixo fluxo (30 mL/h), e sempre cuidando que o volume carregado não excedesse a capacidade da coluna (The QIAexpressionist, 2001).

Durante a etapa da purificação, as condições de lavagem foram críticas para a remoção das proteínas inespecificamente ligadas. Fatores tais como o pH dos tampões de lavagem e eluição, assim como, a concentração do imidazol (agente que compete com a histidina pelas ligações com o níquel), foram determinantes para a adequada separação da **rCDJARA**. Porém, a proteína recombinante, não foi obtida pura, mas, os contaminantes foram considerados não significativos, por representarem uma porcentagem inferior a 1% (calculado por densitometria). Uma etapa subsequente de purificação foi descartada por representar perdas consideráveis na produção protéica. Para a eluição foi utilizado um tampão com baixa força iônica, alta concentração de imidazol (0.5 M) e com um pH afastado do pI da enzima, para enfraquecer as interações entre a proteína e o ligante.

Após a purificação em condições desnaturantes, a proteína heteróloga foi submetida a um processo de re-novelamento com retirada gradativa da uréia. Inicialmente, as frações purificadas foram diluídas com uma solução tamponante contendo ditiotreitol, um agente redutor que desfaz as pontes dissulfeto, (geralmente constituídas em forma incorreta). A partir deste momento, procedeu-se á retirada da uréia, diluindo a solução protéica com um tampão contendo cisteína, cistina, cloreto de cálcio e cloreto de zinco. Estes aditivos tem sido utilizados anteriormente em protocolos de re-novelamento de metaloproteases recombinantes com sucesso (Selistre –de Araújo *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2003).

Na etapa de re-enovelamento, a concentração protéica foi crítica, devendo esta ser inferior a 15 $\mu\text{g/mL}$, para diminuir as interações intermoleculares e a formação de agregados (Futami, *et al.*, 2000). Após a renaturação, a proteína foi concentrada até um máximo de 200 $\mu\text{g/mL}$. Em concentrações maiores foi observada a formação de precipitados insolúveis. Este fenômeno, poderia ser explicado pela alta proporção (37.8%) de resíduos hidrofóbicos na estrutura da proteína heteróloga, além da baixa proporção de resíduos carregados (18.3%).

Durante o trabalho com a proteína heteróloga, foi conferida sua labilidade. Após 24 horas de incubação, a **rCDJARA** se degradava quase que totalmente, gerando um produto de aproximadamente 15 kDa. Este resultado é compatível com o achado de que o domínio metaloprotease da Jararagina (Paine *et al.*, 1992) não foi isolado, até o momento, do veneno da serpente. Usami *et al.*, (1994) demonstram o processo de autólise que sofre a Jararagina ao nível dos resíduos 209 e 210 da proteína madura, gerando duas proteínas, uma consistente no domínio metaloprotease e outra consistente nos domínios desintegrina/rico em cisteínas, denominada Jararagina-C. Estes autores isolaram com sucesso a Jararagina-C, indicando que possivelmente o domínio catalítico sofre rápida autólise o que tem impedido seu isolamento a partir do veneno. Adicionalmente, estudos feitos no nosso laboratório com **svMPs** da classe *P-I* recombinantes, Pró-ACLF e ACLF, determinaram a ocorrência de autólise nestas proteínas (Selistre-de-Araújo *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2003).

Como a proteína foi expressa na forma não zimogênio, ou seja, sem o pró-domínio, o processo de ativação foi obviado, esperando-se que após a etapa de re-enovelamento, a **rCDJARA**, se encontrasse ativa. O sucesso do re-enovelamento,

então, foi seguido pela detecção de atividade proteolítica desta proteína heteróloga sobre o fibrinogênio. O fibrinogênio é uma proteína que participa do processo de formação do coágulo de fibrina, na coagulação sanguínea. Este substrato contém três cadeias (α , β e γ). A **rCDJARA** degrada parcialmente as cadeias α e β , após 4 horas e às 24 horas, as degrada completamente. A Jararagina nativa cliva a cadeia α e β , após uma hora de incubação e as degrada completamente após 24 horas.

A atividade destas proteínas também foi testada sobre substratos da matriz extracelular, como fibronectina, que é uma proteína heterodimérica. A **rCDJARA** cliva a subunidade maior após 24 horas de incubação, enquanto que, a Jararagina nativa produz o mesmo efeito após uma hora de reação. Sobre o colágeno tipo I, um componente da matriz extracelular, nem a Jararagina nativa, nem a **rCDJARA**, mostraram efeito proteolítico.

Adicionalmente, a atividade proteolítica das enzimas recombinante e nativa foi testada sobre o colágeno tipo IV, um substrato da matriz extracelular, que se encontra formando parte da lâmina basal do endotélio vascular. A **rCDJARA** não mostrou nenhuma atividade sobre o colágeno tipo IV após 24 horas de incubação, enquanto que a Jararagina nativa clivou efetivamente este substrato após deste período de reação.

Peptídeos sintéticos derivados da cadeia beta da insulina são frequentemente usados para ensaios de determinação de sítios de clivagem das **svMPs** (Bjarnason e Fox, 1994; Trummal *et al.*, 2000). Neste trabalho, as proteínas recombinante e nativa hidrolisaram o substrato de fluorescência apagada, Abz-LVEALYQ-EDDnp, com evidentes diferenças entre os parâmetros cinéticos das enzimas recombinante e nativa. Também foram observadas diferenças evidentes nos

ensaios de atividade proteolítica sobre fibrinogênio, fibronectina e colágeno tipo IV. A falta de glicosilação na proteína recombinante pode ser uma explicação para esta disparidade. Muitos estudos tem mostrado que em alguns casos o volume hidrodinâmico ocupado pelas cadeias do açúcar é enorme (Perkins *et al.*, 1988; Hart, 1992), por isso, é postulado que, na Jararagina, a glicosilação é essencial para a conformação e o enovelamento protéico, como previamente descrito para outros glicoconjugados (Elbein, 1991; Hart, 1992). Os resíduos do oligossacarídeo incrementam a exposição do sítio de ligação da enzima ao seus respectivos ligantes ou adiciona estabilidade através de interações secundárias entre enzimas e ligantes, como previamente demonstrado em outros modelos (Takeuchi and Kobata, 1991; Veiga *et al.*, 1995). Reforçando estes achados, foram reportadas mudanças na especificidade proteolítica da Rodostoxina após sua deglicosilação, o que sugere que este processo, presumivelmente, causa modificações na interação entre a Rodostoxina e relevantes substratos na membrana (Tan *et al.*, 1997).

Adicionalmente, as diferenças enzimáticas entre as proteínas recombinante e nativa, podem indicar que nem todas as moléculas atingiram a apropriada conformação durante o re-enovelamento. Estes resultados não são surpreendentes, já que, o enovelamento de proteínas globulares com pontes dissulfeto, é um processo complexo (Futami *et al.*, 2000), o que pode ser um limitante para obter proteínas ativas, além de que a conformação nativa pode ser auxiliada pelas ligações com o glicano (Varki, 1993).

Diferenças entre a Jararagina nativa e a **rCDJARA**, também podem ser devidas à presença do domínio desintegrina na Jararagina, que ajuda na modulação

da especificidade catalítica para substratos da matriz extracelular segundo Jeon e Kim, (1999).

A atividade hemorrágica das proteínas nativa e recombinante foi testada sobre pele de camundongos segundo a metodologia de Johnson *et al.*, (1993). A Jararagina nativa (5 µg), demonstrou atividade hemorrágica evidente, enquanto que a **rCDJARA**, não causou nenhum tipo de lesão hemorrágica, mesmo em concentrações 30 vezes maiores (150 µg) do que a usada com a nativa neste trabalho e 150 vezes maiores que a MHD (Dose Hemorrágica Mínima) da Jararagina (que é de 1 µg).

Segundo Paine *et al.*, (1992) aproximadamente 10% da massa molecular da Jararagina madura é atribuída à glicosilação. A análise da seqüência de aminoácidos da Jararagina nativa utilizando a ferramenta SCAN PROSITE (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>), mostrou um único sítio potencial de glicosilação, localizado C-terminalmente no domínio catalítico. A seqüência motivo é NCSY. Este motivo também está presente em outras hemorraginas, tais como, a *P-I*, ACLH (Selistre-de-Araújo e Ownby, 1995) e as *P-III* Rodostoxina (Ponnudurai *et al.*, 1993, e HR1B (Kishimoto e Takahashi, 2002).

Muitas metaloproteases de venenos de serpentes contêm potenciais sítios de glicosilação N-ligados, tais como a Proteinase H (Anderson e Ownby, 1995), HR2A (Miyata *et al.*, 1989), Atrolysin A (Hite *et al.*, 1994), H2-proteinase (Takeya *et al.*, 1989) e LHFII (Sanchez *et al.*, 1991). Apesar de serem potencialmente N-glicosilados, a função e estrutura dos glicoconjugados destas metaloproteases de veneno são desconhecidas. A remoção enzimática dos glicanos da Rodostoxina, a principal hemorragina do veneno da *Calloselasma rhodostoma*, não reduz sua

atividade hemorrágica sobre pele de camundongo (Chung *et al.*, 1996). Em contraste, o tratamento com N-glycosidase F, bloqueou completamente a atividade hemorrágica de duas metaloproteases altamente hemorrágicas de 68 e 62 kDa, purificadas do veneno da *Crotalus viridis viridis* (Li *et al.*, 1993). Depois da N-deglicosilação química ou enzimática do veneno da aranha *Loxosceles intermedia*, não se evidenciaram mudanças nem na atividade trombocitopênica, nem na atividade proteolítica sobre fibrinogênio e fibronectina, do veneno. Em contraste, sua atividade gelatinolítica foi fortemente reduzida para um efeito residual depois da deglicosilação enzimática (Veiga *et al.*, 1999).

Para contribuir a um melhor entendimento do papel da glicosilação na atividade hemorrágica, foi testado o efeito do tratamento com PNGase F sobre a atividade hemorrágica da Jararagina nativa. Após a reação com esta deglicosidase, uma variação de aproximadamente 10% na mobilidade no gel de poliacrilamida, indicou que a N-deglicosilação tinha acontecido. Após este tratamento, a proteína nativa perdeu sua habilidade para induzir hemorragia. Devido ao fato de que a enzima foi incubada por 24h a 37°C, este efeito poderia ser somente uma consequência da degradação por autólise desta proteína. Para descartar esta possibilidade foi montado um controle utilizando a mesma quantidade de proteína, incubada nas mesmas condições da reação de deglicosilação, mas, sem a adição da enzima PNGase F. Este controle demonstrou uma capacidade hemorrágica de aproximadamente 50% da evidenciada para a Jararagina nativa não incubada, no entanto, a atividade hemorrágica estava presente, indicando que a falta de atividade da enzima deglicosilada não era devido à sua auto-degradação. Resultados semelhantes foram obtidos com a ACLH, uma *P-I* isolada do veneno de *Agkistrodon*

contortrix laticinctus (Selistre-de-Araújo e Ownby, 1995). Tanto a ACLH deglicosilada, quanto a ACLH recombinante (expressa em bactéria), perderam sua habilidade para induzir hemorragia, enquanto que o controle da proteína após a incubação manteve 100% da sua atividade hemorrágica sobre pele de camundongos (Garcia *et al.*, 2004, artigo in press). As proteínas glicosilada e deglicosilada não mostraram diferenças na sua atividade proteolítica sobre fibrinogênio. Estes resultados sugerem, fortemente, a existência de uma relação direta da glicosilação sobre a atividade hemorrágica, talvez incrementando a eficiência enzimática. Parece provável que a propriedade hemorrágica desta hemorragina, a Jararagina, seja dependente de modificações pós-traducionais, enquanto que sua atividade proteolítica não é completamente dependente de tais modificações.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho é descrita a expressão em bactéria do domínio catalítico da Jararagina (uma **svMP** da classe *P-III*), proteoliticamente ativa, a **rCDJARA**. O sistema de expressão em *Escherichia coli* foi selecionado principalmente porque carece de modificações pós-traducionais, o que permite utilizar este método como uma técnica *in vivo*, para o estudo da influência da glicosilação na atividade protéica. Neste estudo, foi pesquisada a influência de ditas modificações no efeito proteolítico e hemorrágico de uma das mais estudadas **svMPs**, a Jararagina, uma hemorragina isolada do veneno de *Bothrops jararaca*.

A **rCDJARA** não demonstrou efeito hemorrágico sobre pele de camundongo, enquanto que sua atividade proteolítica sobre fibronectina e fibrinogênio foi preservada.

Diferenças significativas entre as atividades proteolíticas das proteínas recombinante e nativa foram evidenciadas, em todos os diversos substratos utilizados. Estas disparidades provavelmente sejam devidas ao efeito da falta de glicosilação e do domínio desintegrina, na proteína recombinante, o que determina diminuição nas interações enzima-ligando e alterações na especificidade proteolítica, entre outros. Adicionalmente, o processo de enovelamento correto pode ser favorecido pela presença de resíduos de carboidratos no glicoconjugado.

Parece provável que, a propriedade hemorrágica da Jararagina, é dependente de modificações pós-traducionais, enquanto que sua atividade proteolítica não é completamente dependente de tais modificações.

7.REFERÊNCIAS

ABBASZADE, I.; LIU, R.; YANG, F.; ROSENFELD, S.A.; ROSS, O.H.; LINK, J.R.; ELLIS, D.M.; TORTORELLA, M.D.; PRATTA, M.A.; HOLLIS, J.M.; WYNN, R.; DUKE, J.L.; GEORGE, H.L.; HILLMAN JR, M.C.; MURPHY, K.; WISWALL, B.H.; COPELAND, R.A.; DECICCO, C.P.; BRUCKNER, R.; NAGASE, H.; ITOH, Y.; NEWTON, R.C.; MAGOLDA, R.L.; TRZASKOS, J.M.; HOLLIS, G.F.; ARNER, E.C.; BURN, T.C. Cloning and characterization of ADAMTS 11, na aggrecanase from the ADAMTS family. *J. Biol. Chem.* v. 274, 23443-23450, 1999.

ALFANDARI, D.; COUSIN, H.; GAULTIER, A.; SMITH, K.; WHITE, J.M.; DARRIBERE, T.; DESIMONE, D.W. *Xenopus* ADAM-13 is a metalloprotease required for cranial neural crest cell migration. *Curr. Biol.* v. 11, p.918-930, 2001.

ALTSCHUL, S.F.; ET AL. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* v. 215, p. 403-410, 1990.

ANDERSON, S.G.; OWNBY, C.L. Characterization of proteinase-H from *Crotalus adamanteus* venom: lack of cytotoxicity on rat aorta endothelial cells, thrombin-like activity and role in glycosylation. *Toxicon.* v. 33, 261, 1995.

ARCE, V.; BRENES, F.; GUTIERREZ, J.M. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: A histochemical and immunocytochemical study. *Exp. Pathol.* v. 72, p. 211-226, 1991.

ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; MANDELBAUM, F.R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three haemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon.* v. 24, p. 943-946, 1986.

BALLERMAN, B.J.; DARDIK, A.; ENG, A.; LIU, A. Shear stress and the endothelium. *Kidney Int.* v. 54, p.S100-S108, 1998.

BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Identification of the cleavage sites by a hemorrhagic metalloproteinase in type IV collagen. *Matrix.* v. 10, p. 91-97, 1990.

BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; FOX, J.W.; BJARNASON, J.B. Proteolytic digestion of non-collagenous basement membrane proteins by hemorrhagic

metalloproteinase Ht-e from *Crotalus atrox* venom. **Biomed. Biochim. Acta.** v. 4-6, p. 763-768, 1991.

BERTON, G.; LOWELL, C. Integrin signaling in neutrophils and macrophages. **Cellular Signaling.** v. 11, p. 621-635, 1999.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.I.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.T.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; EAGLER, J.A. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.** v. 4, p.197-250, 1993.

BJARNASON, J.B.; TU, A.T. Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of hemorrhagic toxin e. **Biochemistry.** v. 17, p.3395-3404, 1978.

BJARNASON, J.B.; HAMILTON, D.; FOX, J.W. Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler.** v. 369, p.121-129, 1988.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. **Methods Enzymol.** v. 248, 345-368, 1995.

BLACK, R.A.; RAUCH, T.C.; KOZLOSKY, C.J.; PESCHON, J.J.; SLACK, J.L.; WOLFSON, M.F.; CASTNER, B.J.; STOCKING, K.L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K.A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J.N.; JOHNSON, R.S.; PAXTON, R.J.; MARCH, C.J.; CERRETTI, D.P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- α from cells. **Nature.** v. 385, p.729-732, 1997.

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p.248-254, 1976.

BRINKHOUS, K.M.; BARNES, D.S.; POTTER, J.Y.; READ, M.S. von Willebrand syndrome induced by *Bothrops* venom factor: bioassay for venom coagglutinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 78, p.3230-3234, 1981.

CAL, S.; FREIJE, J.M.; LOPEZ, J.M.; TAKADA, Y.; LOPEZ-OTIN, C. ADAM-23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the α 5 β 1 integrin through an RGD-independent mechanism. **Mol. Bio. Cell.** v. 11, p.1457-1469, 2000.

CAL, S.; OBAYA, A.J.; LLAMAZARES, M.; GARABAYA, C.; QUESADA, V.; LOPEZ-OTIN, C. Cloning, expression, analysis, and structural characterization of

seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene*. v. 283, p. 49-62, 2002.

CALLARD, R.E.; GEARING, A.J.H. *The cytokine facts book*. Academic Press, 1994. p. 31.

CARDOSO, J.L.C.; FAN, H.W.; FRANCA, F.O.S.; JORGE, M.T.; LEITE, R.P.; NISHIOKA, S.A.; ET AL. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) São Paulo, Brazil. *Quat. J. Med.* v. 86, p.315-325, 1993.

CHAGAS, J.G.; JULIANO, L.; PRADO, E.S.; Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. *Anal. Biochem.* v. 192, p. 419-425, 1990.

CHANG, J.; MUSSER, J.H.; MCGRECOS, H. Phospholipase A2 function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.* v. 36, p.2429-2436, 1987.

CHEN, R-Q.; JIN, Y.; WU, J-B.; ZHOU, X-D.; LU, Q-M.; WANG, W-Y.; XIONG, Y-L. A new protein structure of *P-II* class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains. *BBRC*. v. 310, p. 182-187, 2003.

CHINTALA, S.K.; SAWAYA, R.; GOKASLAN, Z.L.; RAO, J.S. Modulation of matrix metalloprotease-2 and invasion in human glioma cell by $\alpha 3\beta 1$ integrin. *Cancer Lett.* v. 103, p. 201-208, 1996.

CHUNG, C.M.C.; PONNUDURAI, G.; KATAOKA, M.; SHIMIZU, S.; TAN, H.N. Structural studies on a major hemorrhagin (rhodostoxin) from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper). *Arch. Biochem. Biophys.* v. 325, p.199-208, 1996.

CINTRA, A.C.; VIERA, C.A.; GIGLIO, J.R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* snake venom. *J. Protein. Chem.* v. 9, p.221-227, 1990.

CLISSA, B.P.; LAING, G.D.; THEAKSTON, R.D.G.; MOTA, I.; TAYLOR, M.J.; MOURA-DA-SILVA, A.M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon*. v. 39, p.1567-1573, 2001.

CALVETE, J.J.; SCHRADER, M.; RAIDA, M.; MCLANE, M.A.; ROMERO, A.; NIEWIAROWSKI, S. *FEBS. Lett.* v. 416, p. 197-202, 1997.

COELHO, A.L.J.; FREITAS, M.S.; CARVALHO, A.L.O.; MOURA-NETO, V.; ZINGALI, R.B.; BARJA-FIDALGO, C. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. *Exp. Cell. Res.* v. 251, p.378-387, 1999.

COLIGE, A.; SIERON, A.L.; LI, S.W.; SCHWARZE, U.; PETTY, E.; WERTELECKI, W.; WILCOX, W.; KRALOW, D. ET AL. Human Ehlers-Danlos syndrome type VIIC and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the pro-collagen I N-proteinase gene. *Am. J. Hum. Genet.* v. 65, p.308-317, 1999.

COLLEN, D.; LIJNEN, H.R.; DE COCK, F.; DURIEUX, J.P.; LOFFET, A. Kinetic properties of tripeptide lysyl chloromethyl ketone and lysyl p-nitroanilide derivatives towards trypsin-like serine proteinases. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 615, p.158-166, 1980.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; eds. *Robbins-Pathologic Basis of Disease*. 6 ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p.50-87.

COMINETTI, M.R.; RIBEIRO, J.U.; FOX, J.W.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with $\alpha 5\beta 1$ integrin. *ABB.* v. 416, p.171-179, 2003.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic. Acid. Res.* v. 15, p. 10881-10890, 1988.

CORREA, M.C.J.; MARIA, D.A.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; PIZZOCARO, K.F.; RUIZ, I.R.G. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by snake venom toxin jararhagin. *Toxicon.* v. 40, p.739-748, 2002.

COSTA, E.P.; CLISSA, P.B.; TEIXEIRA, C.F.P.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper venoms-induced local inflammation. *Inflammation.* v. 26, p.13-17, 2002.

DECLERCK, Y.A. Interactions between tumor cells and stromal cells and proteolytic modifications of the extra cellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur. J. Cancer.* v. 36, p.1258-1268, 2000.

DENNIS, E.A. Phospholipase A2 mechanism inhibition and role in arachidonic acid release. *Drug. Dev. Res.* v. 10, p.205-220, 1978.

DENNIS, M.S.; HENZEL, W.J.; PITTI, R.M.; LIPARI, M.T.; NAPIER, M.A.; DEISHER, T.A.; BUNTING, S.; LAZARUS, R.A. Platelet glycoprotein IIb/IIIa protein antagonists from snake venom evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 87, 2471-2475, 1990.

DOOLITTLE, R.F. Fibrinogen and fibrin. *Ann. Rev. Biochem.* v. 53, p.195-229, 1984.

DUNPHY, R. Compartmental organization of the Golgi stacks. *Cell.* v. 42, p.13-21, 1985.

ELBEIN, A.D. Glycosidase inhibitors: inhibitors of N-linked oligosaccharide processing. *FASEB J.* v. 5 p.3055-3063, 1991.

EMSLEY, J.; KNIGHT, C.G.; FARNDALE, R.W.; ET AL. Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha 2\beta 1$. *Cell.* v. 100, p.47-56, 2000.

FENTON, J.W.; OFOSU, F.A.; BREZNIAK, D.V.; HASSOUNA, H.I. Thrombin and antithrombotics. *Semin. Thromb. Hemost.* v. 24, p.87-91, 1998.

FERNANDES, R.J.; HIROHATA, S.; ENGLE, J.M.; COLIGE, A.; COHN, D.H.; EYRE, D.R.; APTE, S.S. Procollagen II amino pro-peptide processing by ADAMTS-3: insights on dermatosparaxis. *J. Biol. Chem.* v. 276, p.31502-31509, 2001.

FERREIRA, S.H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia.* v. 21, p.347-349, 1965.

FAMBROUGH, D.; PAN, D.; RUBIN, G.M.; GOODMAN, C.S. The Cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 93, p.13233-13238, 1996.

FUJII, C.; YANAGI, S.; SADA, K.; NAGAI, K.; TANIGUCHI, T.; YAMAMURA, H. Involvement of protein-tyrosine kinase p72^{syk} in collagen induced signal transductions platelets. *Eur. J. Biochem.* v. 226, p.243-248, 1994.

FUJIMURA, Y.; IKEDA, Y.; MIURA, S.; M.; YOSHIDA, E.; SHIMA, H.; NISHIDA, S.; ET AL. Isolation and characterization of jararaca GPIb-Bp, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.* v. 74, p.743-750, 1995.

FUTAMI, J.; TSUSHIMA, Y.; TADA, H.; SENO, M.; YAMADA, H. Convenient and efficient *in vitro* folding of disulfide-containing globular protein from crude bacterial inclusion bodies. *J. Biochem.* v. 127, p. 435-441, 2000.

GAHMBERG, C.G.; TOLUANEN, M. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins?. *Trends Biochem. Sci.* v. 21, p. 308-311, 1996.

GARCÍA, L.T.; PARREIRAS E SILVA, L.T.; RAMOS, O.H.P.; CARMONA, A.K.; BERSANETTI, P.A.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. The effect of pos-translational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteases. *Comp. Biochem. Physiol.* In press.

GOMIS-RUTH, F-X.; KRESS, L.F.; BODE, W. First structure of a snake venom metalloproteinase/collagenase. *EMBO J.* v. 12, P.4151-4157, 1993.

GONG, W.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structure determination of alkaline haemorrhagin AaH-III from snake venom of *Agkistrodon acutus*. *Sci. China (ser C).* v. 40, 4, p.351-355, 1997.

GOULD, R.J.; POLOKOFF, M.^a; FRIEDMAN, P.A.; HUANG, T.F.; HOLT, J.C.; COOK, J.J.; ET AL. Disintegrin: A family of integrin inhibitory proteins from viper venom. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v. 195, p.168-171, 1990.

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

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. *Mem. Inst. But.* v. 51, p.211-233, 1989.

GUTIERREZ, J.M.; ROMERO, M.; DIAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. v. 33, p.19-29, 1995^a.

GUTIERREZ, J.M.; ROMERO, M.; NUÑEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Mol. Pathol.* v. 62, p.28-41, 1995^b.

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

HART, G.W. Glycosylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 4, p.1017-1023, 1992.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K.K. Snake venom hemorrhagins. *Crit. Rev. Toxicol.* v. 29, p.1-19, 1999.

HATTORI, M.; OSTERFIELD, M.; FLANAGAN, J.G. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science*. v. 289, p.1360-1365, 2000.

HAWIGER, J.; TIMMONS, S.; KLOCZEWIAK, M.; STRONG, D.D.; DOOLITTLE, R.F. γ and α chains of human fibrinogen possess sites reactive with human platelet receptors. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 79, p.2068-2071, 1982.

HEINO, J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol.* v. 19, p.319-323, 2000.

HITE, L.A.; JIA, L.G.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 308 p.182-191, 1994.

HO, P.L.; SERRANO, S.M.T.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; MOURA-DASILVA, A.M.; MENTELE, R.; CALDAS, C.; OLIVA, M.L.O.; BATISTA, I.F.C.; OLIVEIRA, M.L.S. Angiostatin-like molecules are generated by snake venom metalloproteinases. *BBRC*. v. 294, p. 879-885, 2002.

HOLMES, W.E.; NELLES, L.; LIJNEN, H.R.; COLLEN, D.; Primary structure of human α 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (SERPIN). *J. Biol. Chem.* v. 262, p.1659-1664, 1987.

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

HORNEBECK, W.; EMONARD, H.; MANBOISSE, J-C.; BELLON, G. Matrix-direct regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Sem. Cancer Biol.* v. 12, p.231-241, 2002.

HUHTALA, P.; HUMPHRIES, M.J.; MCCARTHY, J.B.; TREMBLE, P.M.; WERB, Z.; DAMSKY, C.H. Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblast adhering to fibronectina. *J. Cell Biol.* v. 129, p. 867-879, 1995.

HUTTON, R.A.; WARRELL, D.A. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood reviews.* v. 7, p.176-189, 1993.

ICHINOCHÉ, T.; TAKAYAMA, H.; EZUMI, Y.; ARAI, M.; YAMAMOTO, N.; TAKAHASHI, H.; OKUMA, M. Collagen-stimulated activation of sky but not e-src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI. *J. Biol. Chem.* v. 272, p.63-68, 1997.

INOUE, D.; REID, M.; LUM, L.; KRATZSCHMAR, J.; WESKAMP, G.; MYUNG, Y.M.; BARON, R.; BLOBEL, C.P. Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrin in bone cells. *J. Biol. Chem.* v. 273, p.4180-4187, 1998.

ITOH, M.; MASUDA, K.; ITO, Y.; ARIZAWA, T.; YOSHIOKA, M.; IMAI, K.; OKADA, Y.; SATO, H.; SEIKI, M. Purification and refolding of recombinant human pro-MMP-7 (pro-Matrilysin) expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *J. Biochem.* v. 119, p.667-673, 1996.

IVASKA, J.; KAPILA, J.; PENTIKAINEN, O.; HOFFREN, A.M.; HERMONEN, J.; HUTTUNEN, P; HEINO, J. A peptide inhibiting the collagen binding function of integrin α 2 I domain. *J. Biol. Chem.* v. 274, p.3513-3521, 1999.

JEON, O.H.; KIM, D.S. Molecular cloning and functional characterization of a snake venom metalloprotease. *Eur. J. Biochem.* v. 263, p.526-534, 1999.

JIA, L.G.; SHIMOKAWA, K.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon.* v. 34, p.1269-1276, 1996.

JIA, L.G.; WANG, X.M.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the

hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 373, p.281-286, 2000.

JOHNSON, E.K.; OWNBY, C.L. Isolation of a hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (Broad-banded copperhead) and pathogenesis of the hemorrhage induced by the toxin in mice. *Int. J. Biochem.* v. 25, p.267-278, 1993.

KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; DESMOND, H.P.; HUTTON, R.A. Systemic haemorrhage in rats induced by a hemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon.* v. 29, p.1097-1105, 1991.

KAMIGUTI, A.S.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.G.; HAY, C.R.M.; ZUZEL, M. Ineffectiveness of the inhibition of the main hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom by its only plasma inhibitor α 2-macroglobulin. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1200, p.307-314, 1994.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; ZUZEL, M. Selective proteolysis of platelet α 2 β 1 integrin (gpIa/IIa) by jararhagin, a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Br. J. Haematol.* v. 89 pp.8, 1995^a.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; ZUZEL, M. Cleavage of von Willebrand factor by jararhagin, a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon.* v. 33 p.260, 1995^b.

KAMIGUTI, A.S.; SANO MARTINS, I.S. South American snake venoms affecting haemostasis. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* v. 14, p.359-374, 1995.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; THEAKSTON, R.D.G.; ZUZEL, M. Insights into mechanism of haemorrhagic caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon.* v. 34, p.627-642, 1996^a.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; ZUZEL, M.; Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of α 2 β 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem. J.* v. 320, p.635-641, 1996^b.

KAMIGUTI, A.S.; MARKLAND, F.S.; ZHOU, Q.; LAING, G.D.; THEAKSTON, R.D.G.; ZUZEL, M. Proteolytic cleavage of the β 1 subunit of platelet α 2 β 1 integrin by the metalloproteinase jararhagin compromises collagen-stimulated phosphorylation of pp72. *J. Biol. Chem.* v. 272, p.32599-32605, 1997.

KAMIGUTI, A.S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R.D.G. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 31, p.853-862, 1998.

KAMIGUTI, A.S.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C.; THEAKSTON, R.D.G.; ZUZEL, M.; FOX, J.W. Identification of sites in the cysteine-rich domain of

the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *FEBS Lett.* v. 549, p. 129-134, 2003.

KAWASAKI, T.; FUJIMURA, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; MIURA, S.; M.; SAKURAI, Y.; ET AL. Complete amino acid sequence and identification of the platelet glycoprotein Ib-binding site of jararaca GPIb-Bp, a snake venom protein isolated from *Bothrops jararaca*. *J. Biol. Chem.* v. 271, p.10635-10639, 1996.

KISHIMOTO, M.; TAKAHASHI, T. Molecular cloning of HR1a and HR1b, high molecular hemorrhagic factors, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *Toxicon.* v. 40, 1369-1375, 2002.

KLOCZEWIAK, M.; TIMMONS, S.; LUCAS, T.J.; HAWIGER, J. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the γ chain. *Biochemistry.* v. 23, p.1767-1774, 1984.

KOBATA, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* v. 209, p.483-501, 1992.

KORNFELD, R.; KORNFELD, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* v. 54, p.631-664, 1985.

KOSHIBA, T.; HOSOTANI, R.; WADA, M.; Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer.* v. 82, p.642-650, 1998.

KUMASAKA, T.; YAMAMOTO, M.; MORIYAMA, H.; TANAKA, N.; SATO, M.; KATSUBE, Y.; YAMAKAWA, Y.; OMORI-SATOH, T.; IWANAGA, S.; UEKI, T. Crystal structure of H2-proteinase from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* v. 119, p.49-57, 1996.

KUNO, K.; KANADA, N.; NAKASHIMA, E.; FUJIKI, F.; ICHIMURA, F.; MATSUSHIMA, K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J. Biol. Chem.* v. 272, p.556-562, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* v. 227, p.680-685, 1970.

LI, Q.; COLBERG, T.R.; OWNBY, C.L. Purification and characterization of two high molecular weight hemorrhagic toxins from *Crotalus viridis viridis* using monoclonal antibodies. *Toxicon.* v. 31 p.711-722, 1993.

LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; BORKOW, G.; OVADIA, M.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Activity of haemorrhagic metalloproteinase BaH1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. *Toxicon.* v. 32, p.505-510, 1994.

LUCA, M.; WARD, C.M.; OHMORI, K.; ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor alpha 2 beta 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 206, p.570-576, 1995.

MANDELBAUM, F.R.; ASSAKURA, M.T. antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from venoms of three species of *Bothrops* snakes. *Toxicon.* v. 26, p.379-385, 1988.

MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, M.M.; RAIDA, M.; VIJAY-KUMAR, S.; HUANG, Z.; LOBB, R.R.; NIEWIAROWSKI, S. *Biochemistry.* v. 38, p. 13302-13309, 1999^b.

MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, M.M.; RAIDA, M.; SHICK, P.; LOBB, R.R.; NIEWIAROWSKI, S. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 12468-12473, 1999^a.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. *Toxicon.* v. 30, p.853-864, 1992.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; SHIMAYA, K.; MIHARA, H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in hemorrhage. *Toxicon.* v. 30, p.1387-1397, 1992.

MARUYAMA, M.; TANIGAWA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H. Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. *Enzyme Protein.* v. 47, p.124-135, 1993.

MATSUSHITA, T.; MEYER, D.; SADLER, J.E.; Localization of von Willebrand Factor-binding site for platelet glycoprotein Ib and botrocetin by charged-to-alanine scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* v. 275, p.11044-11049, 2000.

MAUCH, C.; ADELMANN-GRILL, C.B.; HATAMOCHI, A.; KRIEG, T. Collagenase gene expression in fibroblast is regulated by a three-dimensional contact with collagen. *FEBS Lett.* v. 250, p.301-305, 1989.

MCCAWLEY, L.J.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinase: they're not just for matrix anymore. *Curr. Opin. Cell. Biol.* v. 13, p.534-540, 2001.

MIERENDORF, R.; YAEGER, K.; NOVY, R. The pET system: your choice for expression. *Innovations.* v. 1, p.1-3, 1994.

MIYATA, T.; TAKEYA, H.; OZEKI, Y.; ARAKAWA, M.; TOKUNAGA, F.; IWANAGA, S.; SATOH, T.O. Primary structure of haemorrhagic protein, HR2a,

isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biochem.** v. 105, p.847-853, 1989.

MONTEIRO, R.O.; ZINGALI, R.B. Inhibition of prothrombin activation by Bothrojaracin, a C-type lectin from *Bothrops jararaca* venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 382, p.123-128, 2000.

MOREIRA, L.; BORKOW, G.; OVADIA, M.; GUTIERREZ, J.M. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. **Toxicon.** v. 32, p.977-987, 1994.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G.L.; THEAKSTON, R.D.G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snake. **Toxicon.** v. 29, p.713-723, 1991.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; LAING, G.L.; PAINE, M.J.I.; DENNISON, J.M.T.; POLITI, V.; CRAMPTON, J.M.; THEAKSTON, R.D.G. Processing of pro-tumor necrosis factor by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.** v. 26, p.2000-2005, 1996.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; LINICA, A.; DELLA-CASA, M.S.; KAMIGUTI, A.S.; HO, P.L.; CRAMPTON, J.M.; THEAKSTON, R.D.G. Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: expression in *Escherichia coli* and inhibition of the platelet-collagen interaction. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 369, p.295-301, 1999.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; MARCINKIEWICS, C.; MARCINKIEWICS, M.; NIEWIAROWSKI, S. Selective recognition of $\alpha 2\beta 1$ integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Thromb. Res.** v. 102, p.153-159, 2001.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; DELLA-CASA, M.S.; DAVID, A.S.; ASSAKURA, M.T.; BUTERA, D.; LEBRUN, I.; SHANNON, J.D.; SERRANO, S.M.T.; FOX, J.W. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase Jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 409, p.395-401, 2003.

MURPHY, G.; STANTON, H.; COWELL, S. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. **APMIS.** v. 107, p.38-44, 1999.

NIEUWENHUIS, H.K.; AKKERMAN, J.W.M.; HOUDIJK, W.P.M.; SIXMA, J.J. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. **Nature.** v. 318, p.470-472, 1985.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZEKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; ET AL. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry.** v. 33, p.1843-1849, 1994.

OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In LEE, C.Y. ed. **Snake venoms**. Springer, Berlin. 1979. p.480-546.

OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. a new structure of disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochemistry**. v. 41, p.14248-14254, 2002.

OPDENAKKER, G.; RUDD, P.; PONTING, C.; DWEK, R. Concepts and principles of glycobiology. **FASEB J**. v. 7, p. 1330-1337, 1993.

ORNING, L.; KRIVI, G.; BILD, G.; GIERSE, J.; AQYKENT, S.; FITZPATRICK, F.A. Inhibition of leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase by captopril. **J. Biochem. Chem**. v. 266, p.16507-16511, 1991.

OWNBY, C.L.; BJARNASON, J.B.; TU, A.T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. **Am. J. Pathol**. v. 93, p.201-218, 1978.

OWNBY, C.L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In SHIER, W.T.; MEBS, D. eds. **Handbook of Toxinology**. Marcel Dekker, New York. 1990. p.601-654.

OZEKI, Y.; MATSUI, T.; HAMAKO, J.; SUZUKI, M.; FUJIMURA, Y.; YOSHIDA, E.; ET AL. C-type galactosidase binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch. Biochem. Biophys**. v. 308, p.306-310, 1994.

PAINE, M.J.I., DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.G.; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight haemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem**. v. 267, p.22869-22876, 1992.

PERKINS, S.J.; WILLIAMS, A.F.; RADEMACHER, T.W.; DWEK, R.A. The thy-1 glycoprotein: a three dimensional model. **Trends Biochem. Sci**. v. 13, p.302-303, 1988.

PET SYSTEM MANUAL. 9th Edition. Madison (WI-USA). **Novagen**. 2000.

PONNUDURAI, G.; CHUNG, C.M.C.; TAN, H.N. Isolation and characterization of a hemorrhagin from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayian pit viper). **Toxicon**. v. 31, 997-1005, 1993.

RAMOS, O.H.P; CARMONA, A.K.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Expression, refolding and *in vitro* activation of a recombinant snake venom pro-metalloprotease. **Prot. Exp. Purif**. v. 28, p.34-41, 2003.

- READ, M.S.; SMITH, S.V.; LAMB, M.A.; BRINKHOUS, K.M. Role of bothrocetin in platelet agglutination: formation of an activated complex of bothrocetin and von Willebrand Factor. *Blood*. v. 74, p.1031-1035, 1989.
- RIIKONEN, T.; WESTERMARCK, J.; KOIVISTO, L.; BROBERG, A.; KAHARI, V.M.; HEINO, J. Integrin $\alpha 1\beta$ is a positive regulator of collagenase MMP-1 and collagen $\alpha 1$ (I) gene expression. *J. Biol. Chem.* v. 270, p.13548-13552, 1995.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites of South America. In BUCHERL, W.; BUCKLEY E.E. eds. *Venomous Animal and Their Venoms*. Vol II. New York: Academic Press.1971. p.346-381.
- RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIERREZ, J.M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Exp. Mol. Path.* v. 63, p.186-199, 1995.
- RUCAVADO, A.; NUÑEZ, J.; GUTIERREZ, J.M. Blister formation and skin damage induced by Bap1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int. J. Exp. Pathol.* v. 79, p.245-254, 1998.
- RUCAVADO, A.; FLORES-SANCHEZ, E.; FRANCESCHI, A.; MAGALHAES, A.; GUTIERREZ, J.M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon*. v. 37, p.1297-1312, 1999.
- RUGGERI, Z.M.; WARE, J. The structure and function of von Willebrand Factor. *Thromb. Haemostas.* v. 67, p.594-599, 1992.
- SADLER, J.E. von Willebrand Factor. *J. Biol. Chem.* v. 266, p.22777-22780, 1991.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. In *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Second Edition. Plainview, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- SANCHEZ, E.F.; MAGALHAES, A.; DINIZ, C.R. Purification of a hemorrhagic factor (LHFI) from the venom of the bushmaster snake *Lachesis muta muta*. *Toxicon*. v. 25, p.611-619, 1987.
- SANCHEZ, E.F.; DINIZ, C.R.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the hemorrhagic factor LHFII, a metalloproteinase isolated from venom of bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *FEBS Lett.* v. 282, p.178-182, 1991.
- SCARBOROUGH, R.M.; NAUGHTON, M.A.; TENG, W.; ROSE, J.W.; PHILLIPS, D.R.; NANNIZZI, L. Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J. Biol. Chem.* v. 268, p.1066-1073, 1993.

SCHIRO, J.A.; CHAN, B.M.; ROSWIT, W.T.; KASSNER, P.D.; PENTLAND, A.P.; HEMLER, M.E.; EISEN, A.Z.; KUPPER, T.S. Integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell*. v. 67, p.403-410, 1991.

SCHMITT, J.; HESS, H.; STUNNENBERG, H.G. Affinity purification of histidine tagged proteins. *Mol. Biol. Rep.* v. 18, p.223-230, 1993.

SEKIYA, F.; ATODA, H.; MORITA, T. Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. v. 32, p.6892-6897, 1993.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; OWNBY, C.L. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for metalloproteinases from Broad-banded copperhead, *Agkistrodon contortrix laticinctus*. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 320, p.141-148, 1995.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; SOUZA, E.L.; BELTRAMINI, L.M.; OWNBY, C.L.; SOUZA, D.H.F. Expression, refolding and activity of a recombinant non-hemorrhagic snake venom metalloprotease. *Prot. Exp. Purif.* v. 19, p.41-47, 2000.

SELTZER, J.L.; LEE, A.Y.; AKERS, K.T.; SUDBECK, B.; SOUTHON, E.A.; WAYNER, E.A.; EISEN, A.Z. Activation of 72-kDa type IV collagenase/gelatinase by normal fibroblasts in collagen lattices is mediated by integrin receptors but is not related to lattice contraction. *Exp. Cell. Res.* v. 213, p.365-374, 1994.

SENGER, D.R.; CLAFFEY, K.P.; BENES, J.E.; PERRUZZI, C.A.; SERGIOU, A.P.; DETMAR, M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1 beta1 and alpha2 beta1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 94, 13612-13617, 1997.

SERRANO, S.M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A.; FLINK, E. Purification, characterization and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregation activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. v. 34, p. 7186-7193, 1995.

SERRANO, S.M.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A.; ET AL. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine protease (KN-BJ) from the venom of the snake *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *Eur. J. Biochem.* v. 251, p.845-853, 1998.

SERRANO, S.M.; REICHL, A.P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E.A.; SANTORO, M.L.; SAMPAIO, C.A.; ET AL. A novel phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: Purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 367, p.26-32, 1999.

SHAH, Z.H. HAKKAART, A.J.G.; ARKU, B.; JONG, L.; SPEK, H.V.D.; GRIVELL, L.A.; JACOBS, H.T. The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Ymelp complements a yeast ymel disruptant. *FEBS Lett.* v. 478, p.267-270, 2000.

SHAPIRO, S.D. Matrix metalloproteinase degradation of extra cellular matrix: biological consequences, *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 10, p.602-608, 1998.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* v. 268, p. 82-86, 1993.

SOUZA, D.H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; DELLA-CASA, M.S.; OLIVA, G.; GARRAT, R.C. Crystallization and preliminary X-ray analysis of Jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* snake venom. *Acta Crystall. D. Biol.Cristall.* v. 57, p. 1135-1137, 2001.

SUGIKI, M.; MARUYAMA, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G. Enhancement of plasma fibrinolysis *in vitro* by hemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon.* v. 33, p. 1605-1617, 1995.

TAKEUCHI, M.; KOBATA, A. Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology.* v. 1, p.337-346, 1991.

TAKEYA, H.; ARAKAWA, M.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; OMORI-SATOH, T. Primary structure of H2-proteinase, a non haemorrhagic metalloproteinase, isolated from venom of the Habu snake, *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* v. 106, p.151-157, 1989.

TAKEYA, H.; ODA, K.; MIYATA, T.; OMORI-SATOH, T.; IWANAGA, S. The complete amino acid sequence of the high molecular mass haemorrhagic protein HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biol. Chem.* v. 265, p.16068-16073, 1990.

TAKEYA, H.; NISHIDA, S.; NISHINO, N.; OMORI-SATOH, T.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H.; IWANAGA, S. Primary structures of platelet aggregation inhibitors (disintegrins) autoproteolytically released from snake venom hemorrhagic metalloproteinases and new fluorogenic peptide substrates for these enzymes. *J. Biochem.* v. 113, p.473-483, 1993.

TAN, N.H.; PONNUDURAI, G.; CHUNG, M.C.M. Proteolytic specificity of Rhodostoxin, the major hemorrhagin of *Calloselasma rhodostoma* (Malayian pit viper) venom. *Toxicon.* v. 6, p.979-984, 1997.

TANG, B.L. ADAMTS: a novel family of extra cellular matrix proteases. *IJBCB.* v. 33, p.33-44, 2000.

TANIZAKI, M.M.; ZINGALI, R.B.; KAWAZAKI, H.; IMAJOH, S.; YAMAZAKI, S.; SUZUKI, K. Purification and some characteristics of a zinc metalloproteinases from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*. v. 27, p.747-755, 1989.

THE QIAEXPRESSIONIST, Fifth edition. Basel Switzerland. *Qiagen*. 2001.

TITANI, K.; KUMAR, S.; TAKIO, K.; ERICSSON, L.H.; WADE, R.D.; ASHIDA, K.; WALSH, K.A.; CHOPEK, M.W.; SADLER, J.E.; FUJIWARA, K. Amino acid sequence of human von Willebrand Factor. *Biochemistry*. v. 25, p.3171-3184, 1986.

TOPO TA CLONING INSTRUCTION MANUAL. Version P. Paisley (UK). *Invitrogen*. 2002.

TOPPER, J.N.; GIMBRONE, M.A. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol. Med. Today*. v. 5, p.40-46, 1999.

TORTORELLA, M.D.; BURN, W.C.; PRATTA, M.A.; ABBASZADE, I.; HOLLIS, J.M.; LIU, R.; ROSENFELD, S.A.; COPELAND, R.A.; DECICCO, C.P.; WYNN, R.; ROCKWELL, A.; YANG, F.; DUKE, J.L.; SOLOMON, K.; GEORGE, H.L.; BRUCKNER, R.; NAGASE, H.; ITOH, Y.; ELLIS, D.M.; ROSS, O.H.; WISWALL, B.H.; MURPHY, K.; HILLMAN, JR, M.C.; HOLLIS, G.F.; ARNER, E.C.; ET AL. purification and cloning of aggrecanase: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science*. v. 284, p.1600-1601, 1999.

TRUMMAL, K.; VIJA, H.; SUBBI, J.; SIIGUR, J.; MALDI-TOF mass spectrometry analysis of substrate specificity of lebetase, a direct-acting fibrinolytic metalloproteinase from *Vipera lebetina* snake venom. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1476, p.331-336, 2000.

USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; SHIMA, H.; YOSHIDA, E.; YOSHIOKA, A.; HIRANO, K.; SUZUKI, M; TITANI, K. A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. v. 201, p.331-339, 1994.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides all of the theories are correct. *Glycobiology*. v. 3, p.97-130, 1993.

VAZQUEZ, F.; HASTINGS, G.; ORTEGA, M.A.; LANE, T.F.; OIKEMUS, S.; LOMBARDO, M.; IRUELA-ARISPE, M.L.METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angiogenic activity. *J. Biol. Chem*. v. 274, p.23349-23357, 1999.

VEIGA, S.S.; CHAMMAS, R.; CELLA, N.; BRETANI, R.R. Glycosylation of β -1 integrins in B 16-F10 mouse melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. *Int. J. Cancer*. v. 61, p.420-424, 1995.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; SANTOS, V.L.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxoscelles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence of glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon*. v. 37, p.587-607, 1999.

VU, T.H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. v. 14, p.2123-2133, 2000.

WEISS, H.T.; TURITTO, V.; BAUMGARTNER, H.R. Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIb-IIIa and Ib and storage α -granules. *Blood*. v. 67, p.322-330, 1986.

WEISS, H.T. Flow-related platelet deposition on subendothelium. *Thromb. Haemostas*. v. 74, p.117-122, 1995.

WERR, J.; JOHANSSON, J.; ERIKSSON, E.E.; HEDQVIST, P.; RUOSLAHTI, E.; LINDBOM, L. Integrin $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue. *Blood*. v. 95, 1804-1810, 2000.

WOESSNER, J.F. The family of matrix metalloproteinases. *Ann. NY. Acad. Sci.* v. 732, p.11-21, 1994.

WOLFSBERG, T.G.; WHITE, J.M. ADAMs in fertilization and development. *Dev. Biol*. v. 180, p.389-401, 1996.

WORMALD, M.R.; DWEK, R.A. Glycoproteins glycan presentation and protein fold stability. *Structure*. v. 7, p.R155-R160, 1999.

YU, Q.; STAMENKOVIC, I. Cell surface- localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*. v. 14, p.1163-1176, 2000.

ZHANG, D.; BOTOS, I.; GOMIS-RUTH, F-X.; DOLL, R.; BLOOD, C.; NJOROGE, F.G.; FOX, J.W.; BODE, W.; MEYER, E. Structure interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form-d). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 91, p.8447-8451, 1994.

ZHOU, O.; SMITH, J.B.; GROSSMAN, M.H. Molecular cloning and expression of catrocollastin, a snake venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. *Biochem. J*. v. 307, p.411-417, 1995.

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

ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R.; FRANCISCHETTI, I.M.; GUIMARAES, J.A. *Bothrops jararaca* snake venom: effects on platelet aggregation. ***Thromb. Res.*** v. 58, p.303-316, 1990.