

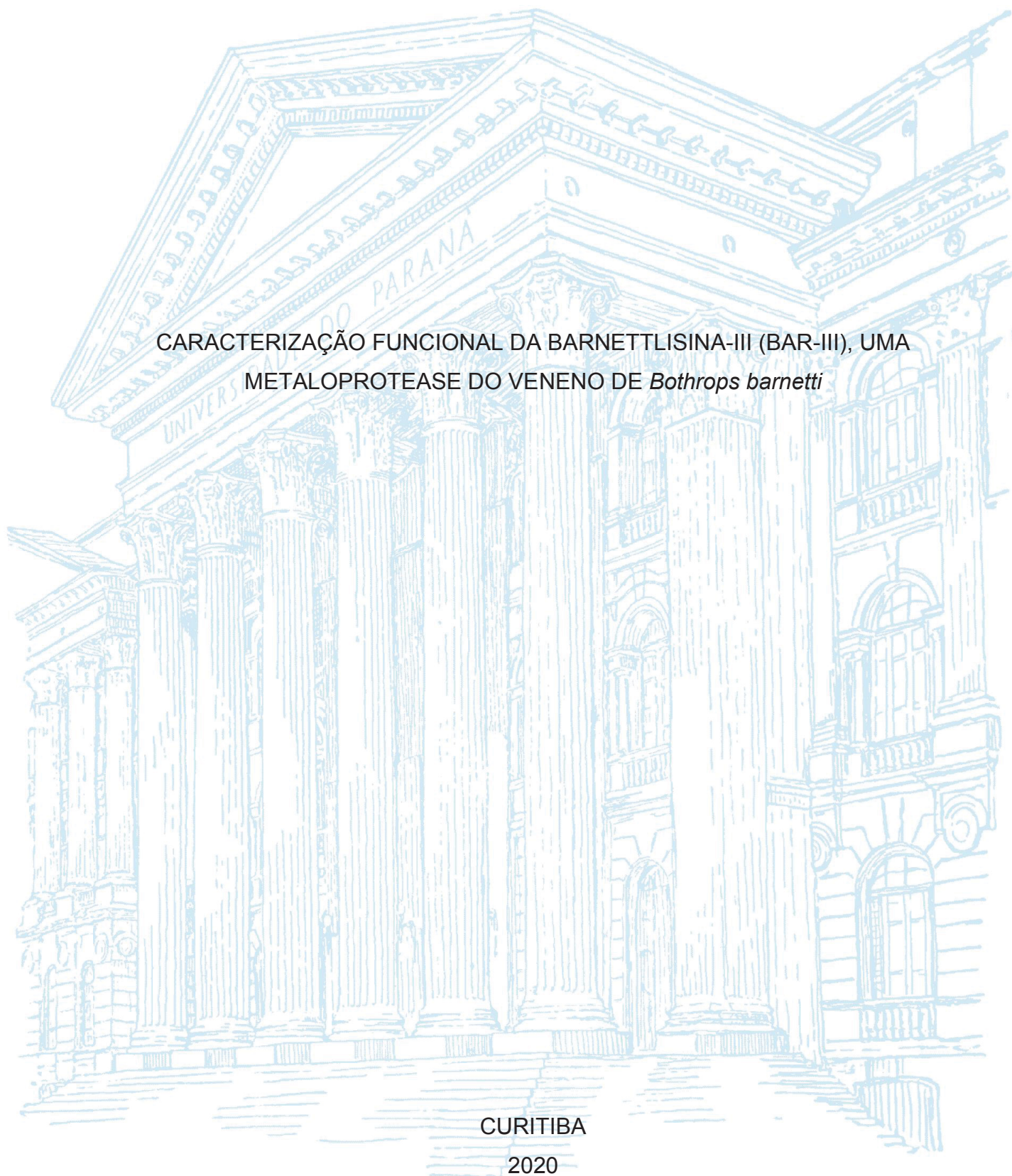
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PEDRO HENRIQUE DE CAIRES SCHLUGA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA BARNETTLISINA-III (BAR-III), UMA
METALOPROTEASE DO VENENO DE *Bothrops barnetti*

CURITIBA

2020



PEDRO HENRIQUE DE CAIRES SCHLUGA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA BARNETTLISINA-III (BAR-III), UMA
METALOPROTEASE DO VENENO DE *Bothrops barnetti*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Luiza Helena Gremski

Coorientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Schluga, Pedro Henrique de Caires
Caracterização funcional da Barnettlisina-III (BAR-III), uma metaloprotease do veneno de *Bothrops barnetti*. / Pedro Henrique de Caires Schluga. – Curitiba, 2020.
78 p.: il.

Orientadora: Luiza Helena Gremski
Coorientador: Sílvio Sanches Veiga

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Cobras venenosas - Veneno 2. Metaloproteases 3. Matriz extracelular I. Título II. Gremski, Luiza Helena, 1982- III. Veiga, Sílvio Sanches, 1962- IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 615.942



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de PEDRO HENRIQUE DE CAIRES SCHLUGA intitulada: *Caracterização funcional da Bar-III, uma metaloproteinase do veneno de Bothrops barnezi*, sob orientação da Profa. Dra. LUIZA HELENA GREMSKI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

02/04/2020 18:22:44.0

LUIZA HELENA GREMSKI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

08/04/2020 17:00:47.0

MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

02/04/2020 21:57:10.0

GABRIEL OTTO MEISSNER

Avallador Externo (INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A realização do sonho de obter o título de mestre não foi conquistado sozinho, sendo assim pretendo por meio deste expressar meu agradecimento a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná, por disponibilizar a estrutura e ambiente rico para discussões científicas. Agradeço também ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e a todos os seus membros, e por fim as instituições de fomento que financiaram a realização deste projeto, Fundação Araucária, CAPES, CNPq e Finep.

Agradeço a Dra Luiza Helena Gremski por me dar a oportunidade de ingressar no programa e ser seu primeiro orientado (junto da Nyanne), sou grato por cada discussão de resultado, aos auxílios valorosos no laboratório com técnicas e conselhos, por demonstrar o caminho a ser seguido para o êxito deste trabalho, a toda sua paciência e compreensão nos momentos de dificuldade, não existe agradecimento suficiente por ter tornado esses dois anos desafiadores um pouco mais prazerosos de superar, Muito obrigado.

Agradeço ao Dr Silvio Sanches Veiga por sua coorientação e contribuição com todos os seus anos de experiência, com grandes dicas e acrescentando sempre para o trabalho executado, seja nas reuniões de laboratório ou durante uma breve conversa sobre os resultados, se alcançarmos metade do conhecimento e experiência que nos passa seremos sem dúvida muito capazes para o caminho que escolhermos trilhar.

Agradeço aos colegas de Pós-graduação do LME que fizeram desse período mais alegre e rico, as ex-colegas, Dra Vanessa R. Heidemann, que me ensinou técnicas de cultivo celular das quais não havia tido contato antes, muito obrigado. A Dra Elidiana de Bona pelas longas discussões de resultados e por toda coragem de desbravar equipamentos que tínhamos medo de manipular e por ensinar a todos. E por fim a Dra Larissa Vuitika. Agradeço também aos amigos e atuais membros do LME, A MSc. Nyanne L. C. Poli com quem divido orientadora, grande amiga que tornou os dias no CPPI mais fáceis, as nossas conversas e trocas de opiniões, A MSc. Antonielle Baldissera, pelos valorosos momentos de risadas, trocas e desabafos, torço muito pelo seu sucesso, pois sua paciência e bom humor são cativantes. A MSc. Hanna C. da Justa, pelos vários momentos que discordamos e

crecemos juntos em conversas que sempre levam a grandes reflexões, agradeço ao auxílio em experimentos com animais e a todos os conselhos, admiro sua dedicação. A MSc Thais P. Silva, Companheira de muitas risadas e de momentos engraçados, uma companhia sempre divertida seja nos momentos de descontração no laboratório como fora dele. A MSc Zelinda Schemczssen, pessoa mais positiva que já conheci e escuta todos os tipos de atrocidades que falo e ainda tenta trazer mensagens positivas, admiro muito a forma que trata as pessoas e como se mantém positiva independentemente dos desafios. A Dra, Marianna Boia, pelos conhecimentos trocados e pelo auxílio na organização do laboratório e por fim ao Rodrigo Z. Zarugner, grande amizade desde o início do mestrado, obrigado por fazer todos os dias mais leves e engraçado, sou seu fã, você é uma das mentes mais brilhantes, porém distraídas que já conheci, agradeço ao Odair que mesmo não sendo do laboratório me ajudou em experimentos e pelas inúmeras conversas de corredor.

Aos alunos de Iniciação científica por toda a dedicação e por serem grandes amigos, Kamila Moreno, Fernando Jacomini (Sorocaba), João Gabriel, Gustavo Carvalho e em especial a Ana Maria, IC que me acompanhou por 1 ano, que com sua experiência prévia no laboratório, me ensinou e trabalhou muito. Tenho certeza que o caminho será muito iluminado para todos esses alunos que trabalham e estudam muito, obrigado pela amizade.

Além das portas do laboratório sou muito grato as pessoas que escutaram meus desabafos ou me escutaram em momentos de euforia, desanimo ou estresse, entre esses em especial agradeço a Jordana B. da Silva por ser minha companheira, por mesmo de longe me escutar de maneira paciente e me aconselhar, só você sabe o quão difícil posso ser como pessoa e você na grande maioria das vezes com paciência e amor me aguentou sempre, obrigado por sempre ser refúgio (Sempre que eu preciso me desconectar, todos os caminhos levam ao mesmo lugar, é o meu esconderijo, meu altar).

Agradeço aos meus pais Jaime e Adaila que sempre foram suporte e exemplos para mim, os admiro muito, pois foram momentos de estresse e de conversas, obrigado por buscarem sempre um ambiente de paz e tranquilidade em nosso lar, em especial ao meu pai pelas caronas matinais do meu pai que poupam cerca de 50 minutos diários de transporte público e por sempre estar disposto a facilitar nossas vidas, a vocês meu muito obrigado e o meu amor. Amo vocês

Aos meus irmãos mais velhos Monica, Jaime e Felipe, obrigado por iluminarem minha vida desde que nasci e por serem sempre pessoas incríveis que levo sempre no meu coração, além disso as minhas sobrinhas Gabriela e Ana Laura que sou muito orgulhoso duas garotas brilhantes e amorosas, sou o tio mais babão deste mundo. Agradeço por fim a toda minha família, avós, tios, primos, cunhados....

Aos meus padrinhos que sempre foram presentes em minha vida e cada conquista que alcanço estão nos meus pensamentos, madrinha Maria obrigado por todo amor e carinho que sempre teve por mim, ao padrinho Israel por todo amor que sempre me deu, a saudade é enorme. Aos meus padrinhos de Crisma Erico e Auzelia pelas viagens, conversas e risadas.

Além disso outro grande desafio paralelo foi o Grupo Semear que coordenei paralelamente ao mestrado, agradeço a todos os amigos que dividem momentos únicos comigo, em especial ao Wagner e Grazi, que sempre me escutam e me ajudam a relaxar quando preciso, obrigado por todas as viagens, NFL, NBA, Videogames, comidinhas, desabafos e risadas, ao valorosos amigos Naldo, Will e Ana, André e Maysa, Costela e Amanda, Talmo e Marlucy, Lucas e Hemely, Ricardo e Regi, Binho, Erika e Iveraldo, Cubas...e a todos (com certeza esqueci alguém, me desculpem desde já)

Por fim agradeço a amigos que se fizeram presentes durante estes dois anos, Vinicius Schluga além de primo uma das pessoas que mais amo e confio nessa vida, a Carol Niemczyk que mesmo na distância conseguimos conversar e reclamar juntos da vida, obrigado por me ouvir mesmo quando a vida de ambos está uma loucura, te amo bola, ao Keven Augusto e Amanda Mazur por proporcionarem momentos engraçadíssimos na minha vida, por me escutarem e se fazerem presentes sempre, ao Fernandinho parceiro de faculdade pra vida, as grandes amigas que mesmo com a distância são amizades de muito valor desde a faculdade, Cami Sayuri, Manu Castro e Thayzi Cecyn. Aos batutas uma amizade de anos de suporte e companheirismo, obrigado Jardel, Samuel, Isabella, Arthur, Laura e Bruna, FOLOFOW.

A todos vocês o meu muito obrigado, obrigado por fazerem meus momentos mais prazeroso, leves e fáceis. A presença, amor e carinho de cada um faz da minha vida completa.

Quanto mais a sociedade se distancia da verdade,
Mais ela odeia aqueles que a revelam.
(George Orwell, 1903-1950.)

RESUMO

Os acidentes ofídicos são caracterizados pela inoculação de um veneno através das presas da serpente, resultando em sintomas característicos de acordo com a espécie, mas que podem levar a grande incapacitação ou óbito dos pacientes. Portanto, recentemente esses acidentes foram reincluídos na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde. No Brasil esses acidentes são divididos em quatro tipos: Crotálicos, Laquéticos, Elapídicos e Botrópicos, sendo este último, responsável por 85% dos acidentes no País. Uma das representantes deste grupo é a *Bothrops barnetti* que apresenta uma importância epidemiológica maior na região da costa Norte do Peru, sendo o seu veneno hemorrágico e altamente letal. Estudos de proteômica já determinaram a composição proteica do veneno total deste gênero. Eles mostram que a maior parte corresponde à um primeiro grupo de toxinas classificadas como metaloproteases de classe I e III, que são mais correlacionados com as manifestações clínicas do envenenamento, onde as pertencentes à subclasse P-III, que contêm, além do domínio catalítico, os domínios desintegrina e rico em cisteína, normalmente estão relacionadas a um quadro hemorrágico profundo. Uma enzima denominada barnettlisina-III (Bar-III), uma metaloprotease da classe P-III, foi purificada do veneno de *Bothrops barnetti*. Um ensaio *in vivo* em camundongo mostrou que a Bar-III apresentou atividade hemorrágica após 24 horas de exposição. Com o objetivo de entender melhor os mecanismos pelos quais a Bar-III provoca hemorragia, a sua atividade sobre componentes da matriz extracelular e sobre células endoteliais foi avaliada. Ensaio bioquímicos mostraram que essa molécula tem atividade gelatinolítica, foi capaz de degradar colágeno I desnaturado e não mostrou atividade sobre colágeno I *in natura*. A Bar-III degradou parcialmente colágeno IV e não teve atividade sobre laminina e entactina. Além disso, mostrou atividade de degradação parcial sobre fibronectina e degradação total de vitronectina, demonstrando atividade sobre algumas moléculas de matriz, atividade já descrita para metaloproteases de outras espécies de serpentes. Nos ensaios utilizando células em cultura, a Bar-III não apresentou atividade citotóxica sobre células endoteliais, mas foi capaz de interferir na ligação destas células com fibronectina. Verificou-se, também, que a toxina se liga de forma específica na superfície dessas células e que a pré-incubação das células com a Bar-III em concentração não citotóxica diminui a marcação com anticorpos anti-integrina subunidade $\alpha 5$, sugerindo uma interação dessa metaloprotease com essa classe de integrinas dessas células. Os resultados apresentados aqui indicam a importância da Bar-III no processo de hemorragia observado no envenenamento por serpentes da espécie *Bothrops barnetti*.

Palavras-chave: 1. *Bothrops barnetti*, 2. Metaloprotease, 3. SVMPs, 4. Desintegrina, 5. Matriz extracelular

ABSTRACT

Ophidian accidents are characterized by the inoculation of a venom through the snake's fangs, resulting in characteristic symptoms according to the species, which can lead to great disability or death of the victims. Therefore, these accidents have recently been included in the World Health Organization's list of Neglected Tropical Diseases. In Brazil, these accidents are divided in four types depending on the involved genus, which can be from *Crotalus*, *Lachesis*, *Elapidae* and *Bothrops*. The Bothropic snakes are responsible for 85% of accidents in the country. One of the representatives of this group is *Bothrops barnetti*, which has a greater epidemiological importance in the region of the northern coast of Peru, with a hemorrhagic and highly lethal venom. Proteomics studies have already determined the protein composition of the total venom of this genus. They show that the majority of proteins correspond to a first group of toxins classified as metalloproteinases from classes I and III. A second group includes serinoproteases, and a third group corresponds to accessory toxin families. The first two groups are more correlated with the clinical manifestations of the envenoming. In the group of snake venom metalloproteinases (SVMPs) there is a subdivision into classes P-I, P-II and P-III, where those belonging to subclass P-III are usually related to a deep hemorrhagic condition. An enzyme called barnettisin-III (Bar-III), a class P-III metalloprotease, has been purified from *Bothrops barnetti* venom. An *in vivo* mouse trial showed that Bar-III showed hemorrhagic activity after 24 hours of exposure. In order to better understand the mechanisms by which Bar-III causes hemorrhage, the activity of this toxin on components of the extracellular matrix and on endothelial cells was evaluated. Biochemical assays have shown that this molecule has gelatinolytic activity, was able to degrade denatured collagen I and showed no activity on collagen I *in natura*. Bar-III partially degraded collagen IV and had no activity on laminin and entactin. In addition, it showed degradation activity on fibronectin and on vitronectin, demonstrating activity on some matrix molecules, an activity already described for metalloproteases of other snake species. In assays using cells in culture, Bar-III did not show cytotoxic activity on endothelial cells, but was able to interfere in the binding of these cells with fibronectin. It was also demonstrated that the toxin binds specifically on the surface of these cells and that pre-incubation of the cells with Bar-III in non-cytotoxic concentration reduces the binding of anti-integrin antibodies ($\alpha 5$ subunit), suggesting an interaction of this metalloprotease with this class of integrins. The results presented herein indicate the importance of Bar-III in the hemorrhage process present after accidents with *Bothrops barnetti* snakes.

Keywords: 1. *Bothrops barnetti*, 2. Metalloprotease, 3. SVMPs, 4. Disintegrin, 5. Extracellular matrix

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DE ACIDENTES OFÍDICOS NO PERÚ DE ACORDO COM GÊNERO DADOS DE ACIDENTES DO INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DO PERU (INS) NO ANO DE 2013.	18
FIGURA 2 - COMPOSIÇÃO DO VENENO DA SERPENTE BOTHROPS BARNETTI:	22
FIGURA 3 – CLASSIFICAÇÃO DAS SVMPS DE ACORDO COM SUAS SUBUNIDADES	25
FIGURA 4– ESTRUTURA DE MEMBRANA BASAL:.....	30
FIGURA 5– REPRESENTAÇÃO DE ATIVIDADES GERAIS DAS SVMPS SOBRE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC):	32
FIGURA 6- ANÁLISE DE PURIFICAÇÃO DA BAR-III POR GEL DE SDS-PAGE: ...	33
FIGURA 7- ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA BAR-III NA PELE DE CAMUNDONGOS APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO A BAR-III.....	42
FIGURA 8- ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DA BAR –III	43
FIGURA 9- ATIVIDADE DA BAR- III PURIFICADA DO VENENO DE <i>B. BARNETTI</i> SOBRE COLÁGENO I	44
FIGURA 10- ATIVIDADE DA BAR -III SOBRE COLÁGENO I DESNATURADO:.....	45
FIGURA 11- ATIVIDADE FIBRONECTINOLÍTICA DA BAR- III PURIFICADA DO VENENO DE <i>B. BARNETTI</i> :.....	46
FIGURA 12- ATIVIDADE DA BAR- III PURIFICADA DO VENENO DE <i>B. BARNETTI</i> SOBRE VITRONECTINA.....	47
FIGURA 13- ATIVIDADE DA BAR- III PURIFICADA DO VENENO DE <i>B. BARNETTI</i> SOBRE LAMININA E ENTACTINA	48
FIGURA 14- ATIVIDADE DA BAR- III PURIFICADA DO VENENO DE <i>B. BARNETTI</i> SOBRE COLÁGENO IV	49
FIGURA 15- EFEITO DA BAR-III E VENENO TOTAL DE <i>B. BARNETTI</i> SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS APÓS 2 HORAS DE EXPOSIÇÃO:	53
FIGURA 16- EFEITO DA BAR-III E VENENO TOTAL DE <i>B. BARNETTI</i> SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO.....	54
FIGURA 17– IMUNODETECÇÃO DA BAR-III PURIFICADA POR ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-BAR-III GERADOS EM COELHO	57

FIGURA 18- IMUNODETECÇÃO DE VENENO DE B. BARNETTI POR ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-BAR-III.....	57
FIGURA 19- CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA BAR-III SOBRE CÉLULAS RAEC ANALISADA POR CITOMETRIA DE FLUXO	58
FIGURA 20- CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA BAR-III SOBRE INTEGRINAS A5 DE CÉLULAS RAEC ANALISADA POR CITOMETRIA DE FLUXO	59

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS RAEC FRENTE A EXPOSIÇÃO A BAR - III NO TEMPO DE 2 HORAS	50
GRÁFICO 2 - VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS RAEC FRENTE A EXPOSIÇÃO A BAR - III NO TEMPO DE 24 HORAS	51
GRÁFICO 3- VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS RAEC FRENTE A EXPOSIÇÃO A BAR - III NOS TEMPOS DE 2 HORAS E 24 HORAS:	52
GRÁFICO 4 - VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS RAEC SOLTAS FRENTE A EXPOSIÇÃO A BAR - III NOS TEMPOS DE 2 HORAS E 24 HORAS	55
GRÁFICO 5- ADESÃO CELULAR DE CÉLULAS RAEC EM PLACA SENSIBILIZADA COM FIBRONECTINA APÓS EXPOSIÇÃO A BAR - III POR 2 HORAS	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DE ATIVIDADE ENTRE VENENOS DO GÊNERO BOTHROPS:	21
TABELA 2 - PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO EM COELHOS, DEMONSTRANDO INTERVALO DE INOCULAÇÃO E DOSES CRESCENTES INOCULADAS DE BAR-III.	39
TABELA 3- TABELA DE PROPORÇÕES DE ENZIMA (BAR-III) E SUBSTRATO (MOLÉCULA DE MATRIZ EXTRACELULAR) UTILIZADAS PARA OS TESTES DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO.	36

SUMÁRIO

1 OBJETIVOS	16
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 SERPENTES E ACIDENTES OFÍDICOS.....	17
2.2 VENENO DE SERPENTES DO GÊNERO <i>BOTHROPS</i>	18
2.3 <i>BOTHROPS BARNETTI</i>	20
2.4 METALOPROTEASES DE VENENO DE SERPENTES (SVMP).....	23
2.5 INTEGRINAS E DESINTEGRINAS.....	26
2.6 MATRIZ EXTRACELULAR.....	28
2.7 ATIVIDADE DE SVMP	31
2.8 BARNETTLISINA-III (BAR-III)	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	34
3.2 PRODUÇÃO DE SORO ANTI-BAR-III	38
3.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	35
3.4 ENSAIO DE ATIVIDADE HEMORRÁGICA EM CAMUNDONGOS.....	34
3.5 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	35
3.6 ZIMOGRAMA	36
3.7 ENSAIOS DE CULTIVO CELULAR	36
3.8 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE AZUL DE TRIPAN	36
3.9 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR LUMINESCÊNCIA	37
3.10 ENSAIO DE ADESÃO.....	38
3.11 ANÁLISE DE WESTERN BLOTTING.....	39
3.12 ANÁLISE DA LIGAÇÃO DA BAR-III NA SUPERFÍCIE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	40
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	41
4.1 ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA BAR-III EM CAMUNDONGOS.....	41
4.2 DEGRADAÇÃO DE MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR	42
4.3 EFEITO DA BAR-III SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS	49

5 DISCUSSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO	
ANIMAL	75

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho tem como objetivo a caracterização funcional de uma proteína do veneno da serpente *Bothrops barnetti*, a barnettlisina 3 (Bar-III), uma metaloprotease de veneno de serpente de classe III.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade hemorrágica local da proteína Bar-III
- Verificar a atividade enzimática da barnettlisina-III (Bar-III) sobre diferentes proteínas que compõem a matriz extracelular
- Investigar a atividade direta da Bar-III e do veneno de *B. barnetti* sobre células endoteliais em cultura
- Analisar a atividade da Bar-III e do veneno de *B. barnetti* sobre mecanismos de adesão entre as células endoteliais e a matriz extracelular

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ACIDENTES OFÍDICOS

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em Junho de 2017 adicionou acidentes ofídicos na lista de doenças tropicais negligenciadas, buscando um controle efetivo para esse problema de saúde pública. De acordo com o Relatório internacional de prevenção de injúrias infantis da OMS (2008), havia mais de 400.000 casos de incapacitação por acidentes ofídicos, devido a propriedade dos venenos de serpentes possuírem componentes dermonecróticos, citotóxicos, miotóxicos ou hemorrágicos em seus venenos, causando danos ao tecido conjuntivo e a células epiteliais e musculares (WHO, 2018).

Os acidentes ofídicos ainda são um importante problema de saúde pública devido à sua alta frequência e severidade. Existem aproximadamente três mil espécies conhecidas de serpentes e 20% delas venenosas. Essas serpentes são classificadas em quatro grandes famílias: Hydrophidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae (MATSUI et al., 2000). Em países tropicais a magnitude do número de acidentes não é bem conhecida pois eles ocorrem predominantemente em espaços rurais, muitas vezes afastados dos centros de saúde, o que dificulta o registro de acidentes (BUSTAMANTE e FLORES, 2007).

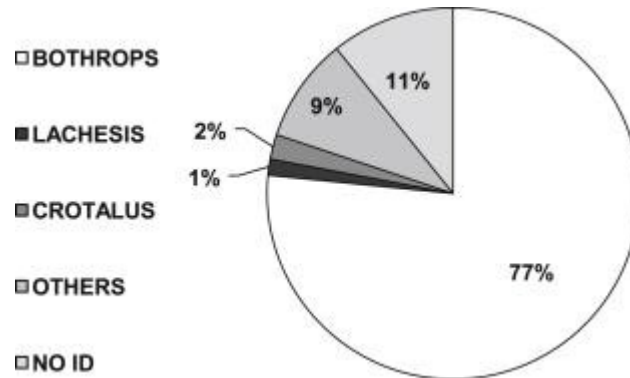
Na América Latina um país muito afetado por envenenamentos ofídicos é o Peru (ZAVALETA e SALAS, 1996). Este país possui uma diversidade grande de espécies de serpentes dos quatro gêneros mencionados sendo considerados um alto risco para a população local. A maior parte dos acidentes com esses animais ocorrem nas zonas silvestres, sendo que a maior taxa de letalidade é na região amazônica (CAMPBELL e LAMAR, 2004).

No ano de 2013, 2143 acidentes com venenos ofídicos foram notificados segundo o Instituto Nacional de Saúde do Peru. Grande parte desses acidentes ocorre em áreas isoladas como por exemplo na costa norte do país, sendo os dados existentes considerados imprecisos por esse motivo (Ministério de Saúde do Peru, 2013).

Diversos estudos apontam as espécies do gênero *Bothrops* como as principais agressoras na região do Peru (entre 61 a 88%), sendo que a espécie *B.*

atrox é a mais comum dentro do seu gênero para as zonas da selva, *B. barnetti* para a costa norte e *B. pictus* para as costas centro e sul (BUSTAMANTE et al., 2007).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DE ACIDENTES OFÍDICOS NO PERÚ DE ACORDO COM GÊNERO DADOS DE ACIDENTES DO INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DO PERU (INS) NO ANO DE 2013.



O quadro de envenenamento do gênero *Bothrops spp.*, é caracterizado por efeitos inicialmente locais como edema, inflamação e lesão tecidual envolvendo necrose e formação de bolhas, mas que também podem se manifestar em outros locais do corpo. Além de graves efeitos sistêmicos, como eventos hemorrágicos espontâneos, coagulação intravascular disseminada e choque cardiovascular secundário à hipovolemia e vasodilatação (CRUZ et.al., 2009).

2.2 VENENO DE SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS*

Venenos de serpentes são compostos de várias enzimas, glicoproteínas, polipeptídeos e outros componentes não-proteicos. Localizados em um par de glândulas especializadas, seus venenos auxiliam as serpentes a imobilizar, digerir presas e a defende-las de predadores e ameaças (CALVETE *et al*, 2009; MACKESSY, BAXTER, 2006). Alguns estudos demonstram que toxinas de serpentes podem ser agrupadas em famílias de proteínas enzimáticas e não enzimáticas, que podem conter atividades diferentes quanto a seus efeitos farmacológicos ou no envenenamento (KANG et al, 2011; ÂNGULO, *et al* 2009).

A maior parte dos venenos possui natureza proteica (de 90 a 95% dos seus componentes) (FOX, *et al* 2004), já a porção não proteica é em sua maioria composta por moléculas inorgânicas como cálcio, ferro, zinco, cobre, sódio,

magnésio, fosforo, entre outros, muitos deles relacionados a componentes enzimáticos presentes nos venenos (WARREL, 2010).

Entre os principais componentes proteicos do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* estão as Fosfolipases A2, metaloproteases, serinoproteases, L-amino ácido oxidases, hialuronidases, nucleotidases, e fosfodiesterases. Além dessas há também proteínas não enzimáticas, como miotoxinas sem atividade de fosfolipases, lectina tipo C, desintegrinas, proteínas ricas em cisteínas (WARREL, 2010; KANG, 2011).

Fosfolipases A2 possuem em sua maioria atividade de hidrólise de fosfolipídeos de membrana, gerando mediadores lipídicos que desempenham funções centrais em atividades celulares (KINI *et al*, 2003). Na ação dos venenos essas enzimas podem desempenhar atividade neurotóxica, miotóxica, cardiotoxica, hemorrágica, hemolítica e edematogênica (SOARES *et al*, 2003, MONTECUCO *et al*, 2008).

As serinoproteases do veneno de serpentes (SVSPs) são enzimas glicoproteicas, possuem massa molecular entre 26 e 67 kDa, essas enzimas interferem nos processos de agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise, sendo uma molécula associada a distúrbios hemostáticos (SERRANO; MAROUN, 2005). Em sua maioria SVSPs atuam como enzimas tipo trombina, produzindo seus efeitos coagulantes pela clivagem de fibrinogênio em fibrina, enquanto outras delas atuam como ativadoras de plasminogênio, convertendo-o em plasmina (MAROUN, 2001; SERRANO, 2013).

As L-amino ácido oxidases, são proteínas presentes nos venenos de serpentes da família Viperidae. São enzimas que catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos para α -ceto-ácidos, levando à formação de amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SAJEVIC *et al.*, 2011). Embora o papel dessas toxinas nos venenos ainda não esteja completamente esclarecido, sabe-se que elas podem influenciar a agregação plaquetária, ativando-a ou inibindo-a (RODRIGUES *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2010) e contribuir para as hemorragias, além de induzir apoptose em células endoteliais através da produção do peróxido de hidrogênio (DU e CLEMETSON, 2010). Várias atividades biológicas da LAOs tem sido relacionadas com o H_2O_2 produzido durante a reação catalisada por esta enzima. Entre elas, a indução de apoptose (SUHR e KIM, 1999), inibição e indução de agregação plaquetária (STÁBELI *et al.*, 2004) atividade anticoagulante (SAKURAI *et al.*, 2003)

atividade anti-viral, anti-parasitária e hemolítica (ALI et al., 2000; TEMPONE et al., 2001; ZHANG et al., 2003)

2.3 *Bothrops barnetti*

Espécimes dessa serpente concentram-se no deserto costeiro do Peru. É uma espécie endêmica do Peru que se encontra nas regiões de La Libertad, Lambayeque e Piura (CAMPBELL e LAMAR, 2004). As serpentes da espécie *B. barnetti* apresentam triângulos pretos e brancos na superfície corporal e geralmente crescem até 120 cm, sendo as fêmeas menores e mais finas (Figura 2) (CARRILLO DE ESPINOZA et al., 1995).

Estudos comparativos a respeito de atividades tóxicas de vários venenos botrópicos do Peru descrevem dados sobre as atividades biológicas do veneno das serpentes dessa espécie. Os resultados mostram que o veneno apresenta uma dose hemorrágica mínima (DHM) de $0.75\mu\text{g} \pm 0,26$, menor do que a DHM dos venenos das outras espécies estudadas (*B. atrox*, *B. brazili* e *B. pictus*). Estudos da atividade edematogênica evidenciaram valores de desenvolvimento de edema menores para *Bothrops barnetti* comparados a *B. brazili*, e *B. atrox*. No entanto, para a atividade dose coagulante mínima (DCM), o veneno de *B. barnetti* apresenta valores de $21,5\mu\text{g} \pm 0,45$; *B. brazili* com $7,39\mu\text{g} \pm 0,06$ e *B. atrox* $3,65\mu\text{g} \pm 0,02$, evidenciando que o veneno de *B. barnetti* afeta o sistema hemostático com menor intensidade do que os outros venenos estudados. A maior letalidade para este grupo de venenos botrópicos expressada como dose letal média (LD50) pertence a *B. barnetti* ($2,66\mu\text{g}$), seguido pelo veneno de *B. brazili* ($5,51\mu\text{g}$) e de *B. atrox* com ($6,04\mu\text{g}$) (Tabela 1) (Rojas et al., 2005).

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DE ATIVIDADE ENTRE VENENOS DO GÊNERO BOTHROPS:

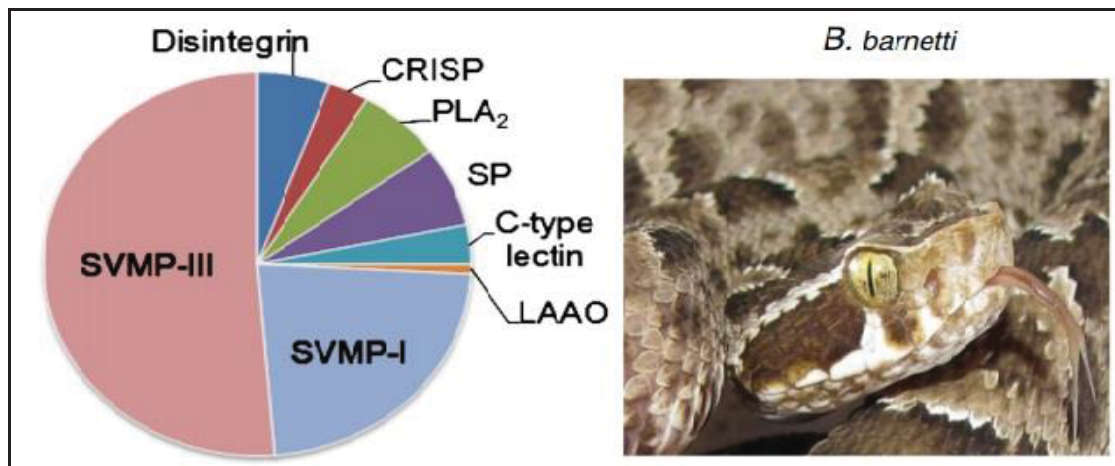
Veneno	Dose letal	Dose hemorrágica	Formação de edema
<i>B. barnetti</i>	2,66µg	0,75µg	1,13µg
<i>B. Atrox</i>	6,04µg	6,45µg	2,95µg
<i>B. brazili</i>	5,51µg	3,71µg	1,18µg
<i>B. pictus</i>	2,78µg	1,06µg	0,52µg

Comparação de Dose letal (LD50), dose de atividade hemorrágica (DHM) e dose formadora de edema entre venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Fonte: Adaptado de Rojas *et al.*, 2005

O veneno de serpentes botrópicas contém uma grande diversidade de proteínas. Estudos proteômicos (Figura 2) do veneno demonstraram, em especial, elevados níveis de Metaloproteases de venenos serpente (SVMP) que podem ser divididas em classes PI, PII e PIII, sendo PI e PIII as mais abundantes nessas serpentes (em especial de classe PIII, compondo 51,2% do veneno total de *B. barnetti*). Essas proteínas desempenham um papel importante no quadro dos acidentes botrópicos, uma vez que são responsáveis pelos danos teciduais locais, caracterizados por edema, hemorragia, dermonecrose e reações inflamatórias, e levando a drásticas alterações em mecanismos hemostáticos (KOHOLHOF *et al.*, 2012).

Esta análise do proteoma do veneno dessa espécie mostra que a sua composição geral está de acordo com as suas propriedades farmacológicas: a elevada quantidade de SVMPs da classe P-III que é expressa pela glândula de veneno pode estar correlacionada com a severidade do quadro hemorrágico desencadeado pelas suas toxinas (KOHOLHOF *et al.*, 2012).

FIGURA 2 - COMPOSIÇÃO DO VENENO DA SERPENTE BOTHROPS BARNETTI:



A imagem à esquerda mostra um gráfico que descreve a composição proteica do veneno da serpente *Bothrops barnetti*, baseado em análise proteômica. O veneno é composto por moléculas desintegrina, CRISP (*Cysteine-rich secretory proteins*), fosfolipase A2 (PLA₂), serino proteases (SP), lectinas do tipo-C, L-amino-ácido oxidases (LAAO) e metaloproteases de veneno de serpente (SVMP), sendo composto em sua maioria por metaloproteases de tipo III. A imagem da direita mostra o aspecto de uma serpente da espécie *Bothrops barnetti*. (adaptado de Koholhof et al., 2012)

Houve um estudo com uma serinoprotease purificada do veneno de *B. barnetti*, denominada Barnetobina. Ela é uma enzima coagulante semelhante à trombina e foi caracterizada como uma glicoproteína monomérica de 52kDa. Estudos da sua atividade demonstraram características fibrinogenolíticas e fibrinolíticas *in vitro*, além de, em testes *in vivo*, demonstrar ações desfibrinogênicas. Assim, atribuiu-se à essa serinoprotease uma característica anti-trombótica (RUIZ, et al., 2013).

Recentemente foi purificada uma SVMP da classe I do veneno de *B. barnetti*, chamada Barnettlisina-I (Bar-I). Ela foi caracterizada como um polipeptídeo com cerca de 23 kDa com sequência muito semelhante a outros membros da família das SVMPs. Ela degrada fibrina e fibrinogênio pela clivagem das suas cadeias α . Além disso, degrada fibronectina plasmática, mas não laminina ou colágeno I. A Bar-I dissolve, *in vitro*, coágulos de fibrina feitos tanto com fibrinogênio purificado como com sangue total. Ao contrário de muitas outras SVMPs, a Bar-I não tem atividade hemorrágica, mas inibe agregação plaquetária presumivelmente por clivar vWF e GPIIb. Além disso, essa protease cliva um domínio ligante de colágeno da integrina $\alpha 2\beta 1$, o que explica a inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno (SANCHEZ et al., 2016).

2.4 METALOPROTEASES DE VENENO DE SERPENTES (SVMP)

O veneno produzido pelas serpentes do gênero *Bothrops* possui diferentes atividades biológicas. Em geral, o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* manifesta-se com reações inflamatórias graves com dano tecidual complexo, o que inclui graves alterações hemostáticas, hemorragia, edema, formação de bolhas e necrose do tecido muscular; esses sinais geralmente vão além do local da mordida. Os efeitos sistêmicos, nesse caso, incluem hemorragia espontânea (da qual a hemorragia cerebral é a manifestação mais séria), coagulação intravascular disseminada e choque cardiovascular secundário à hipovolemia e vasodilatação (CRUZ et al., 2009). A composição do veneno de diversas espécies de *Bothrops*, incluindo a *B. barnetti*, já é conhecida. Informações sobre perfil proteômico, de propriedades biológicas e o perfil de imunorreatividade frente à antivenenos deixam claro que um pequeno número de famílias de toxinas patogênicas compõe o veneno das espécies de *Bothrops*. Como mencionado acima, as principais toxinas são as metaloproteases (SVMPs, classes P-I e P-III), serinoproteases (SVSPs) e as chamadas famílias de toxinas “acessórias”, como as L-aminoácido-oxidases (L-AAOs) e fosfolipases A₂ (PLA₂s). Estes são os componentes mais tóxicos e mais abundantes e que mais frequentemente têm correlação com os aspectos clínicos das vítimas de envenenamento (ESTEVÃO-COSTA et al., 2016).

As SVMPs constituem uma família de enzimas proteolíticas dependentes de metal (GUTIERREZ et al. 1995). As metaloproteases de venenos de serpente pertencem, juntamente com as ADAMs, à sub-família das reprotolisinas. As reprotolisinas, por sua vez, fazem parte do grupo das metzincinas, que são aquelas metaloproteases dependentes de Zn²⁺. O sítio ativo do domínio metaloprotease tem uma sequência consenso HEXXHXXGXXHD e uma volta de metionina (*Met-turn*), que contém um resíduo de metionina conservado que forma uma base para as três histidinas que ligam o zinco na sequência consenso (MARKLAND, 2013).

As SVMPs são produzidas na glândula de veneno como pré-pro-domínio na forma de precursores inativos ou zimogênios (GRAMS et al., 1993; GUTIERREZ et al., 2000). O pré-domínio é caracterizado por uma sequência de 18 aminoácidos e direciona a proteína nascente para o interior do retículo endoplasmático para que a proteína seja processada e secretada. Já o pró-domínio, possui cerca de 200

aminoácidos, e supõe-se que esteja envolvido na inativação da SVMP no interior da glândula de veneno, apresentando uma sequência conservada, PKMCGV, que é relacionada ao mecanismo de controle de atividade das SVMPs, através do bloqueio do sítio catalítico ou processamento proteolítico do pró-domínio gerando seu estado ativo (STOCKER, BODE, 1995).

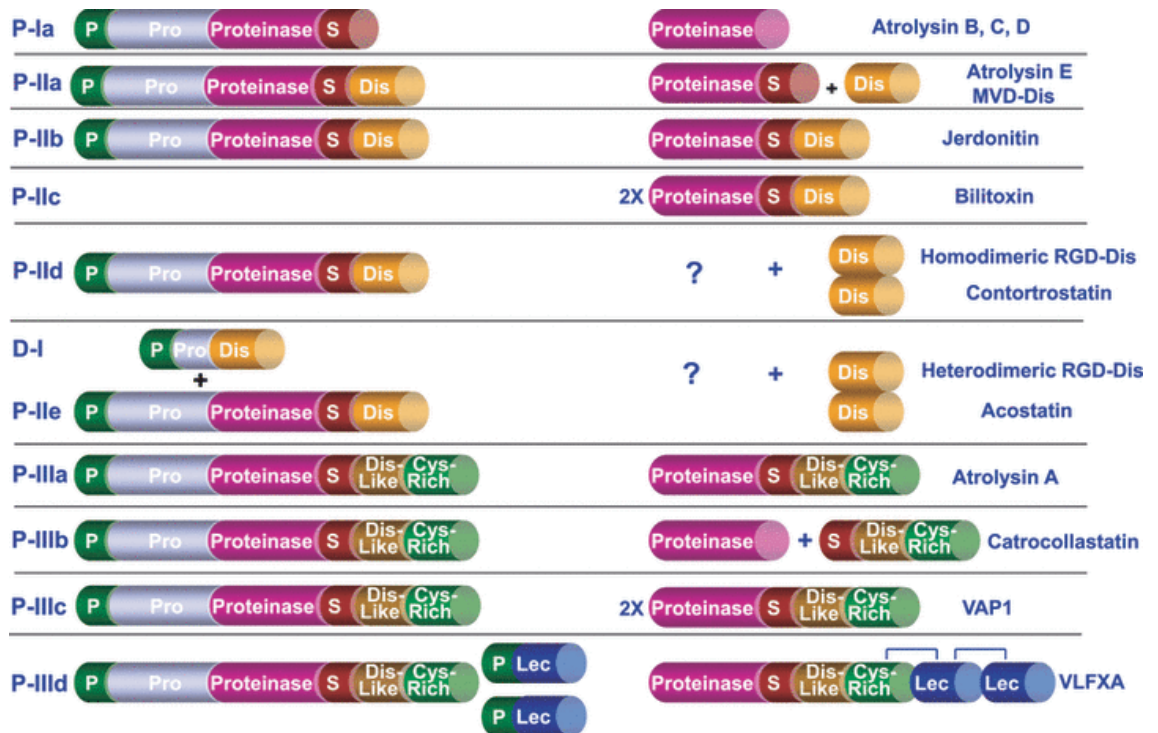
Foi proposto por Fox e Serrano (2008), uma classificação com 11 classes e subclasses de SVMPs, sendo elas diferenciadas pela presença ou não de domínios não catalíticos (P-Ia, P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId, P-IIe, D-I, P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc e PIIId), (Figura 3).

A classe P-Ia possui baixa massa molecular (20 a 30 kDa), em geral possuem menor ação hemorrágica. Essa classe tem como origem precursores com domínios pré, pró e catalítico, porém no seu estágio final mantém apenas o sítio catalítico, em sua maioria essas moléculas possuem atividades fibrinogenolíticas, mionecróticas e pró-inflamatórias (GUTIERREZ, RUCAVADO, 2000).

Nas SVMPs P-II adiciona-se aos precursores dos de tipo P-I o precursor desintegrina, as desintegrinas possuem de 50 a 60 aminoácidos, e em sua grande maioria possuem um sítio RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico) que compete com integrinas de membrana plasmática, tendo como consequência, por exemplo, a inibição de agregação plaquetária (CALVETE *et al.* 2005), porém algumas SVMPs P-II podem ter seus domínios catalíticos e desintegrina não processados (P-IIb), com desintegrinas diméricas e sítio catalítico ativo (P-IIc), ter desintegrinas homodiméricas (P-IId) ou desintegrinas heterodiméricas (P-IIe) (FOX; SERRANO, 2008).

A classe de SVMPs P-III é geralmente classificada como de característica hemorrágica, possuem alta massa molecular (50 a 100 kDa) e se originam dos precursores pré, pró, catalíticos, desintegrina e ricos em cisteína. Moléculas P-III podem ser encontradas com os domínios catalíticos, desintegrina e rico em cisteína (P-IIIa), já outras podem sofrer processamento proteolítico no sítio catalítico, gerando uma molécula com sítio desintegrina e rico em cisteína (P-IIIb), além de poder ser encontrada de forma dimérica (P-IIIc) e de poder ter a adição de dois domínios tipo lectina em sua porção carboxi-terminal (FOX; SERRANO, 2008).

FIGURA 3 – CLASSIFICAÇÃO DAS SVMPS DE ACORDO COM SUAS SUBUNIDADES



P: pré domínio, Pro: pro-domínio, Proteinase: domínio metaloprotease, S: Sequência de aminoácidos entre domínio catalítico e desintegrina, Dis: Domínio desintegrina, Dis-like: Domínio tipo-desintegrina, Cys-Rich: Domínio rico em cisteína, Lec: Domínio ligante de Lectina (adaptado de Fox e Serrano, 2008).

A maior parte dos estudos da literatura que relatam as atividades biológicas das SVMPS tratam da atividade hemorrágica dessa classe de enzimas, porém essa variedade de processamentos e moléculas geradas as confere as mais diversas atividades descritas para essas moléculas. Entre elas pode-se citar atividades fibrino(geno)lítica, ativadora de protrombina, ativadora do fator X de coagulação sanguínea, apoptótica, inibitória de agregação plaquetária, pró-inflamatória e de inativação de inibidores de serinoprotease do sangue, além disso o mecanismo de ação é também descrito como capaz de hidrolisar componentes de membrana basal nos capilares e proteínas plasmáticas (sendo uma etapa crucial no processo de envenenamento), porém o mecanismo usado para esse rompimento de capilares é incerto (MARKLAND, 2013.; GUTIERREZ *et al.*, 2005). Além disso é descrita sua interação com integrinas de superfície de células endoteliais, ativando ou inibindo respostas celulares, interferindo em processos de adesão e sinalização. (SOUZA *et al.* 2000; SCHATTFNER *et al.* 2005).

2.5 INTEGRINAS E DESINTEGRINAS

A transdução de sinais entre matriz extracelular e a célula é dependente de receptores integrinas, e essa sinalização ocorre via adesões focais. A interferência nesse processo (tanto relacionado a matriz ou adesão célula-célula e adesão célula-matriz extracelular) pode alterar diversas respostas celulares, sendo esse tipo de interferência o meio mais comum de atuação das SVMPs. (MOURA-DA-SILVA *et al*, 2001).

A adesão célula-matriz dependente de integrinas, é um processo chave para diversos eventos celulares, como migração, organização de tecidos e diferenciação (ZAMIR, GEIGER, 2001), além disso, a transdução de sinal entre matriz extracelular e células é também realizada por integrinas, e essa interação entre matriz extracelular, integrina e citoesqueleto acontece principalmente via adesões focais, sendo assim, alterações ou interferência em algum destes componentes pode gerar diversas respostas celulares. (BERRIER *et al*, 2007)

Estruturalmente integrinas são proteínas heterodiméricas, compostas por subunidades α e β associadas por ligações não covalentes (HYNES, 1987). As integrinas são classificadas de acordo com os tipos e combinações de cada uma de suas subunidades, as duas subunidades são transmembrana e possuem propriedades adesivas e desempenham papel de sinalização. Grande parte de suas cadeias são extracelulares e uma pequena parte da cadeia está na face intracelular. (WOLPERT, 2000).

Em sua maioria, integrinas se conectam a sítios RGD (Arginina-Glicina_Ácido aspártico) presente em ligantes, usualmente proteínas de matriz extracelular, como colágeno, laminina, fibronectina, fibrinogênio, fator de von Willebrand e vitronectina (RUOSLATHI, 1987). Sabe-se também que sequências EILDV e REDV também podem mediar essas interações. As evidências mostram que cada heterodímero específico fornece um padrão único de sinalização celular, uma vez que um par específico de integrina se liga preferencialmente a diferentes componentes da MEC. Por exemplo, as integrinas $\alpha 4 \beta 1$ se ligam às sequências EILDV e REDV na fibronectina, enquanto as integrinas $\alpha 5 \beta 1$ reconhecem a sequência RGD (PLOW *et al*, 2000). O complexo integrina-ligante reconhece o ambiente extracelular para desencadear respostas celulares, incluindo sobrevivência, divisão, migração e invasão celular (AKSORN, CHANVORACHOTE, 2019).

Com a ligação de ligantes extracelulares a integrinas, há mudanças de mobilidade lateral dessas moléculas na membrana plasmática, concentrando localmente mais destas proteínas, podendo esta aproximação de integrinas ativar cascatas de sinalização. (SILVA *et al*, 2007)

A ligação Célula-Matriz ou Célula-Célula, mediadas por integrina podem ser interrompidas por uma sequência peptídica com propriedades desintegrinas. Essas proteínas contêm o sítio RGD e por competição ocupam as integrinas, evitando assim estas ligações (WOLPERT, *et al*, 2000).

Sendo assim alterações estruturais e funcionais de integrinas podem gerar alterações fisiológicas, sendo uma das doenças associadas a estes defeitos a trombose que é causada pela agregação plaquetária mediada por integrinas do tipo $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, (FURIE, 2009). Integrinas com subunidades tipo β1 e β2 , são essenciais em direcionar o sistema imune ao sítio de inflamação, e alterações nas integrinas com essas cadeias, levam a uma deficiência de adesão de leucócitos, impedindo assim a sinalização e ativação de células T, causando uma disfunção no sistema imune (COX *et al*, 2010).

Ainda falando da participação desses receptores em importantes processos celulares, sabe-se que as integrinas β1 , β3 , αv e α5 têm um papel importante no processo de metástase de células tumorais e na sobrevivência de pacientes. Estudos mostraram que a integrina $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ facilita a invasão de células tumorais de linhagens de câncer de mama, rim e bexiga (MIERKE *et al*, 2011). Utilizando modelos tridimensionais de cultura de células tumorais de pâncreas, pesquisadores mostraram que a integrina $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ medeia a adesão dessas células à componentes de matriz extracelular como a fibronectina (GRZESIAK, BOUVET, 2007). Um anticorpo quimérico humano que interage com integrinas $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ está sendo avaliado em testes clínicos de fase II para melanoma metastático e carcinoma de células renais (KUWADA, 2007).

As integrinas $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ ligam-se ao sítio RGD na fibronectina, assim como as integrinas αv (VAN DER FLIER *et al*, 2010). Evidências têm mostrado a importância das integrinas α5 e αv no desenvolvimento vascular e angiogênese, já que ambas têm como ligante a fibronectina, a proteína de matriz extracelular mais essencial para o desenvolvimento vascular (LAUREN *et al*, 2009, VAN DER FLIER *et al*, 2010). Tanto o desenvolvimento vascular quando a angiogênese não são inibidos quando somente uma dessas integrinas é inibida, mas quando há inibição

simultânea, esses processos celulares são inibidos (LAUREN *et al*, 2009, VAN DER FLIER *et al*, 2010). Esses e outros aspectos das integrinas evidenciam a importância do estudo destas moléculas e moléculas que interagem com as integrinas, por serem potenciais alvos farmacológicos.

2.6 MATRIZ EXTRACELULAR

A Matriz Extracelular (MEC) é responsável pelo suporte estrutural entre os tecidos. A MEC é formada por algumas macromoléculas como colágenos fibrilares, fibras elásticas, glicoproteínas e proteoglicanos e alguns tipos celulares são encontrados entre a matriz (SUKI e BATES, 2008). Essas moléculas têm como características possuírem variados sítios ativos, interagindo de maneira diversa com receptores (KLEINMAN, 2003). A composição da MEC é definida por um processo dinâmico de degradação e produção de proteínas características de MEC. (LU *et al*, 2012), a MEC também possui funções como, manutenção e nutrição de células (EGEBLAD, 2010; GAGGIOLI, 2016), e está diretamente envolvida em processos de proliferação, diferenciação, polaridade e migração de células. (HYNES, 2009).

A MEC possui propriedades cruciais para manutenção local, criando um conceito de microambiente, possuindo propriedades bioquímicas, biomecânicas e físicas (LOPEZ *et al*, 2008). Suas propriedades físicas são relacionadas a suas organizações espaciais e grau de solubilidade, ajudando assim na sustentação tecidual, formando uma propriedade de barreira e também modulando sítios de ancoragem (Interferindo na migração celular, alterando sua interação com receptores integrina) (LU, WERB, 2012). Suas propriedades bioquímicas estão em sua maioria relacionadas a sinalização celular, envolvendo a sensibilidade e interação celular, gerando assim alterações ou manutenção em níveis de expressão gênica e de comportamento celular na região. (HYNES, 2009). Suas características biomecânicas são relacionadas principalmente por sua arquitetura fibrosa, que gera variada rigidez e estabilidade da MEC, gerando assim uma proteção contra estresses tensionais (GEHLER *et al*, 2009). A composição da MEC controla estas propriedades e essa composição varia de acordo com os tecidos que envolvem.

Um tipo especializado de MEC é a lâmina basal (ou membrana basal), que é uma camada fina e flexível de moléculas de matriz que confere suporte a células epiteliais. Essa camada possui entre 40 e 120 nm de espessura (Figura 4), sendo

que essa lâmina circunda também células musculares, adiposas e de Schwann (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2000). A lâmina basal é responsável por separar o epitélio do tecido conectivo próximo, além disso a lamina basal pode ter função filtrante quando localizada em glomérulos renais (BREEN, 2000)

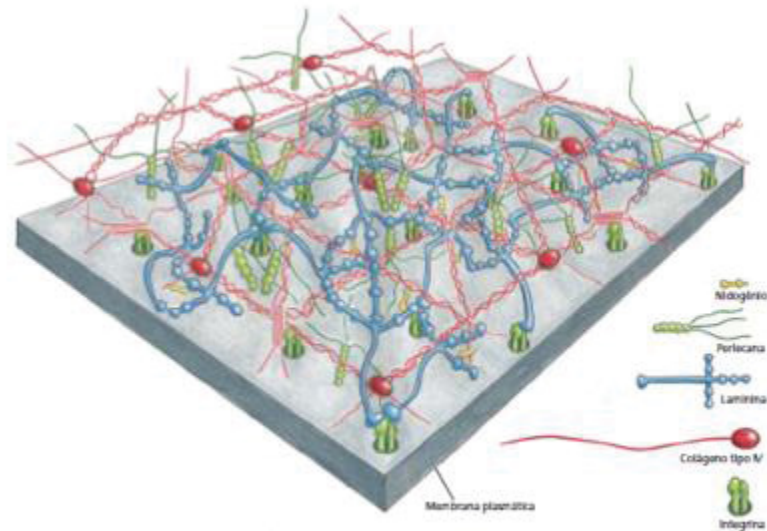
Essas laminas basais possuem também a propriedade de determinar a polaridade celular, sustentação a tecidos epiteliais, organizar proteínas na membrana plasmática, influenciar processos de metabolismo, proliferação, diferenciação celular, estabilidade dos vasos e neovascularização. (AUMAILLEY e KRIEG, 1996, FOX *et al*, 2001, DAVIS, SENGER, 2005).

No tecido epitelial, a lâmina basal, em sua maioria é composta por glicoproteínas como colágeno IV, laminina e entactina (nidogênio).

A laminina é uma das maiores moléculas componentes da membrana basal e é uma glicoproteína que forma um heterotrímero de cadeias que variam. São descritos 5 tipos de cadeias α , 3 de cadeias β e cadeias γ . A combinação dessas cadeias gera diferentes formas de lamininas com propriedades distintas (MINER e YUCHENKO, 2004). Essa proteína é conhecida como a organizadora primária no desenvolvimento da lâmina basal, estando envolvida nos processos de adesão, migração, proliferação e apoptose (AUMAYLLEY e SMYTH, 1998).

O Colágeno IV, é o componente mais abundante da membrana basal. Ele é um tipo de colágeno formador de rede, que consiste de três longas cadeias sintetizadas separadamente, que se unem e formam uma hélice. Essa formação se distingue de colágenos fibrilares em especial por interrupções da sequência repetitiva característica dos colágenos em aproximadamente 20 regiões ao longo de sua estrutura, conferindo a essa molécula a propriedade de flexibilidade. Esses segmentos helicoidais são também responsáveis por interações laterais entre o colágeno IV e outras moléculas, o que gera resistência à tração local (YURCHENCO e RUBEN, 1988). Já a entactina ou nidogênio, é uma proteína de aproximadamente 150 kDa, composta por 3 domínios globulares conectados por segmentos em forma de haste. Estas moléculas possuem características adesivas e auxiliam nas propriedades adesivas e de resistência da membrana basal, caracteristicamente se ligando de forma cruzada a dois componentes da lâmina basal: a laminina e o colágeno IV (FOX *et al*, 1991).

FIGURA 4– ESTRUTURA DE MEMBRANA BASAL:



Composta em sua maioria por glicoproteínas como laminina, colágeno tipo IV e nidogênio, estando meio extracelular e intracelular em constante comunicação via ligação de sua glicoproteína com receptores de membrana integrinas. (Adaptado de Willey-Liss, 2000)

Além da lâmina basal, a matriz extracelular também pode estar organizada em uma forma mais comum nos tecidos, esta denominada matriz intersticial. Um dos membros mais conhecidos da classe de proteínas de matriz é a fibronectina, uma glicoproteína essencial nas interações célula-matriz. Essa glicoproteína é um dímero composto por duas grandes subunidades unidas por pontes dissulfeto, e possui sítios capazes de se ligarem a colágenos, proteoglicanos e a integrinas nas superfícies celulares. (PETERSEN et al, 1983, MANABE et al, 1997).

A fibronectina pode ser encontrada tanto de forma solúvel, circulando no sangue, e pode ser encontrada no formato insolúvel na forma de fibrila de fibronectina, formando dímeros de fibronectina e fazendo parte da matriz extracelular (MATSUDA,1982).

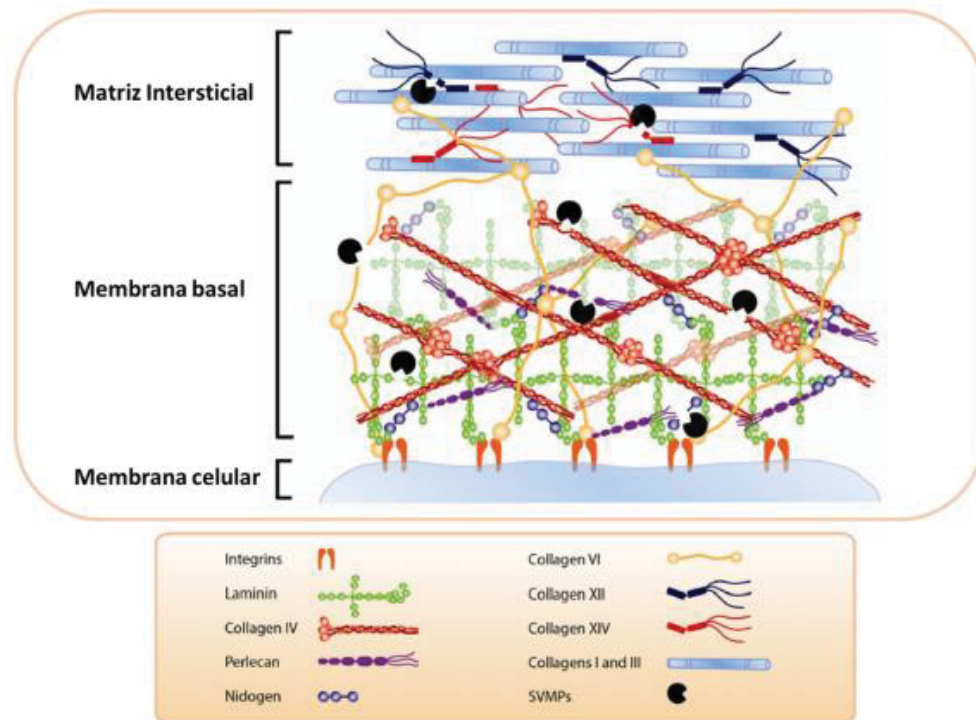
Outra proteína presente no plasma humano é a vitronectina ou *serum spreading factor*, que é uma glicoproteína com propriedades adesivas. Além de presente no plasma, pode ser encontrada em líquido amniótico, urina, plaquetas e matriz extracelular (HAYMAN et al, 1983; TOLLEFSEN et al, 1990). Esta glicoproteína está envolvida na regulação de fibrinólise, onde interage com um inibidor de plasminogênio (derivado de plaquetas) (BHAKDY et al 1988), além de se ligar a receptores na superfície celular de fibroblastos, e células endoteliais, mediando a ligação entre estas células (SUZUKI et al, 1985).

Outra molécula de matriz muito encontrada na matriz extracelular é o colágeno I, estruturalmente é composto por 3 cadeias α , que formam domínios colágenos, na sua região N e C terminal possuem dois domínios não colágenos (BROWN e TIMPL, 1995), essa molécula é um heterotrímero formado da união de duas cadeias $\alpha 1$ idênticas e uma cadeia $\alpha 2$, esse heterodímero é comumente encontrado em tecido conectivos, tendões, ligamentos, tendões e pele, e tem atividade de manutenção estrutural e reparo de tecidos (GELSE et al 2003), além desses pode interferir no processo de adesão e agregação plaquetária, via receptor de glicoproteína VI e $\alpha 2\beta 1$ (SARRAT, 2005).

2.7 ATIVIDADE DE SVMP

As SVMPs de classe P-III podem agir como ligantes solúveis de integrinas, competindo com seus ligantes naturais, além de terem a capacidade de interagir diretamente na hidrólise de componentes da Matriz extracelular (figura 5), interferindo de maneira direta neste processo. Por essas suas atividades proteolíticas e anti-adesivas, elas reduzem interações célula-matriz, e diversos autores relacionam essas características com a atividade hemorrágica dessas toxinas (MOURA-DA-SILVA *et al*, 2001, BALDO *et al*, 2015).

FIGURA 5– REPRESENTAÇÃO DE ATIVIDADES GERAIS DAS SVMPS SOBRE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC):



SVMPs (semi círculos pretos) podem degradar diversos componentes da MEC como diversos tipos de colágenos, laminina, perlecan e nidogênio e componentes que ligam membranas basais a MEC intersticial, desestabilizando assim sua organização original, podendo desempenhar papel central no quadro hemorrágico do envenenamento por essas propriedades. (adaptado de GUTIERREZ, *et al.*, 2016)

A jararagina uma SVMP hemorrágica de classe P-III, pode se acumular na membrana basal das vênulas e dos vasos capilares, facilitando a hidrólise do colágeno IV, com conseqüente enfraquecimento e ruptura da parede dos capilares. Além disso, algumas dessas enzimas interagem com moléculas de matriz extracelular tais como o colágeno e componente das membranas basais. (BALDO *et al.*, 2015).

As desintegrinas e os peptídeos semelhantes à desintegrina interagem com as integrinas, se ligam à superfície de células malignas ou normais, e interferem com as interações célula-célula e célula-matriz. A ligação integrina-desintegrina resulta na interferência ou ativação de vias de transdução de sinais que podem ser exploradas na pesquisa biomédica. Por exemplo, a contortostatina, uma desintegrina dimérica isolada de *Agkistrodon contortrix*, liga-se às integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ inibindo o crescimento tumoral e angiogênese em camundongos *naked* (ZHOU *et al.*, 2000, SWENSON *et al.*, 2005). A desintegrina DisBa-01 de *Bothrops*

alternatus inibe a adesão de uma linhagem humana de células endoteliais microvasculares-1 (HMEC-1) que expressa $\alpha\beta 3$ e de uma linhagem celular de melanoma murino (B16F10) à vitronectina, inibindo a sua proliferação (RAMOS et al., 2008). A leberagina-C é um outro exemplo de SVMP (família semelhante à desintegrina /rico em cisteína) com atividade direta em células: é capaz de inibir agregação plaquetária e também é capaz de inibir a adesão de células de melanoma em fibrinogênio e fibronectina, por interferir na função das integrinas $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 6$ e $\alpha 5\beta 1$ (LIMAM et al., 2010).

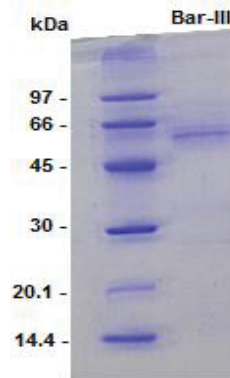
Desta forma é possível concluir que as SVMPs agem rompendo adesões focais, clivando moléculas de MEC e processando componentes endógenos. Esses efeitos, por sua vez, podem causar alterações irreparáveis em propriedades hemostáticas e teciduais, tendo papel importante em quadros hemorrágicos, sendo este sintoma característico de envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops spp.*

2.8 BARNETTLISINA-III (BAR-III)

Como há poucos estudos com relação a moléculas do veneno de *B. barnetti*, é de interesse agregar conhecimento sobre as funções dessas moléculas no processo de envenenamento. Além disso, elas possuem um potencial de aplicação biotecnológica, em especial metaloproteases de classe P-III por possuírem o sítio desintegrina e serem capazes de interagir com diversos receptores de superfícies celulares. (CALVETE *et al.* 2005)

Sendo assim foi purificada pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) a barnettlisina-III, SVMP de classe P-III ainda não descrita na literatura. Para purificação a Bar-III foi isolada do veneno total da serpente *B. barnetti* por cromatografia de exclusão por tamanho via coluna Sephacryl S-200 HR e troca iônica DEAE sepharose seguidas por uma segunda etapa de exclusão por tamanho utilizando coluna Sephacryl S-300 HR. Em seguida a purificação foi confirmada por análise em gel de SDS-PAGE (Laemmli, 1970), mostrado na Figura 6, no qual a Bar-III demonstra massa molecular de aproximadamente 60 kDa.*

FIGURA 6- ANÁLISE DE PURIFICAÇÃO DA BAR-III POR GEL DE SDS-PAGE:



Análise em gel de SDS-Page 10%, da Bar-III apresentando mobilidade eletroforética de aproximadamente 60kDa.**

Além da purificação existem alguns resultados prévios mostrando que na sequência aminoacídica da Bar-III está presente uma sequência RGD (Arg-Gly-Asp) dentro do domínio desintegrina dessa metaloprotease.*¹

Sendo assim, os resultados desse projeto vão incorporar informações sobre os mecanismos de atuação dessa nova enzima para esclarecer seu papel no envenenamento e suas características particulares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Todas as proteínas utilizadas nos testes, tiveram sua concentração estimada através do método de Bradford (Bradford, 1976) adaptado para microensaio em placa de 96 poços. A absorbância foi mensurada em 490 nm no leitor de ELISA (Meridiam ELX 800).

3.2 ENSAIO DE ATIVIDADE HEMORRÁGICA EM CAMUNDONGOS

O ensaio foi realizado para avaliar a ação da Bar-III na região subcutânea de camundongos, afim de elucidar sua ação hemorrágica *in vivo*. O teste foi realizado

¹Comunicação pessoal por correio eletrônico com Debora Priscila Larangote de Oliveira em 26 de setembro de 2018, Mestranda do Programa de Pós-graduação de Bioquímica da Universidade federal de Minas Gerais (UFMG), Orientada do professor Eládio Oswaldo Flores Sanchez.

de acordo com método de Kondo, *et al.* (1960), no qual a Bar-III foi inoculada nas quantidades de 1µg, 5µg, 15µg via subcutânea em camundongos de linhagem Swiss, concentrações testadas em 4 animais (n=4), como controle negativo foi usado PBS (Cloreto de Sódio 100 mM; Tampão Fosfato de Sódio 10 mM; pH 7,3). Animais foram eutanasiados e o folheto interno da pele foi observado 24 horas após sua inoculação.

3.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As amostras foram submetidas à corrida eletroforética em SDS-PAGE em concentrações variadas de poliacrilamida de acordo com a mobilidade requerida por cada amostra. Para desnaturação da amostra (quando desejado), estas foram fervidas por 10 minutos ou mais, e utilizado tampão de amostra 4x redutor com adição de 10% de β-mercaptoetanol. Os géis foram submetidos a corrente de 25 mA e após o fim deste processo o gel foi corado com Azul de Coomassie Brilhante R-250 por 10 minutos e descorados com solução de metanol 30%, alternativamente os géis foram transferidos para membrana de nitrocelulose para posterior técnica de *western blotting*.

3.4 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

Para testar a capacidade de degradar moléculas de matriz, tais como Fibronectina, Vitronectina e Colágenos I e IV, a barnettlisina-III (Bar - III), foi incubada, *in vitro*, nos tempos de 0,5, 2, 6, 16 e 24 horas, com essas moléculas em condições de temperatura e pH adequado para cada uma, sendo as temperaturas de 37°C para Fibronectina, Vitronectina e Colágeno I, Laminina e 25°C para Colágeno IV.

As proporções de enzima:substrato variaram de acordo com a molécula, segundo protocolo específico (Tabela 3). Em seguida os perfis de degradação foram verificados utilizando a técnica de eletroforese em gel médio de poliacrilamida (SDS - PAGE), utilizando condições redutoras. Após as corridas as bandas foram coradas com corante Coomassie Blue (Laemmli, 1970).

TABELA 2- TABELA DE PROPORÇÕES DE ENZIMA (BAR-III) E SUBSTRATO (MOLÉCULA DE MATRIZ EXTRACELULAR) UTILIZADAS PARA OS TESTES DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO.

Molécula de MEC	Proporção enzima : substrato
Colágeno I	1:50
Colágeno I Desnaturado	1:100
Fibronectina (FN)	1:50
Vitronectina	1:100
Laminina	1:50
Colágeno IV	1:50

3.5 ZIMOGRAMA

Para a análise do zimograma foi utilizado um gel 10% de poliacrilamida copolimerizado com 0,2% de gelatina como substrato. Amostras da toxina foram diluídas em tampão não redutor nas quantidades de 1µg, 5µg, 10µg e 15µg, e submetidas a eletroforese a 4°C. Após a corrida o gel foi lavado com solução de Triton X-100 2,5% e incubado overnight a 37°C em tampão ótimo para atividade enzimática (50nM de Tris pH 7,3, 200nM de NaCl, 5mM de CaCl₂ e 5mM de MgCl₂). Por fim o gel foi corado com corante Azul de Coomassie (Laemmli, 1970).

3.6 ENSAIOS DE CULTIVO CELULAR

Para esses testes foram utilizadas células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) (Buonassisi, 1993), cultivadas em meio F12 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 40 mg/L do antibiótico Gentamicina. As células foram mantidas em estufa à 37°C, em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

As células foram subcultivadas em garrafas via tratamento com solução de enzimas Viocase (Sigma), após formação de camada confluyente de células. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

3.7 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE AZUL DE TRIPAN

As células RAEC foram cultivadas em placas de 12 poços em condições normais de cultivo durante 24 horas. Após esse período o meio usual foi substituído

por meio sem SFB com a toxina nas concentrações de 5µg/mL, 20µg/mL e 50µg/mL, experimentos feitos em duplicata. Como controle negativo foi, PBS foi adicionado no meio (mesmo volume de solução de toxina). O veneno total de *B. barnetti* também foi testado.

Após tempos de 2 e 24 horas a 37°C o sobrenadante dos poços foi coletado, e posteriormente o volume reunido com o volume de célula aderidas que foram soltas, de acordo com cada grupo experimental, além dos controles.

Em seguida, em eppendorfs, foi adicionado o corante Azul de Tripán (Corante Azul de trypan 0,4% diluído em PBS (Gibco BRL) à suspensão de células na proporção de 1:10 (corante:suspensão). Após homogeneização a suspensão foi transferida para um hemocitômetro, onde foi feita a contagem de células viáveis e não viáveis, segundo o método de exclusão do corante.

Alternativamente o mesmo teste foi feito usando células soltas, no qual células em suspensão foram incubadas com Bar-III nas concentrações de 10 µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL e mantidas sobre leve rotação em estufa a 37°C nos tempos de 2 e 24 horas, as etapas seguintes foram feitas como descrito acima.

3.8 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR LUMINESCÊNCIA

Para execução dos testes foi utilizado o Kit comercial CellTiter-Glo™ (Promega). Células RAEC foram cultivadas por 24 horas e, após esse período, o meio com SFB foi substituído por meio sem SFB com a toxina na concentração de 20 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. PBS foi usado como controle negativo e o veneno total também foi testado. Foram testados os tempos de incubação de 2 e 24 horas.

Após o período de incubação foi adicionado igual volume de reagente de CellTiter-Glo™ (Promega) como indicado pelo fabricante. Após a adição a placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Para quantificação final da viabilidade, a absorbância dos poços foi medida em 490 nm por equipamento Tecan infinite® M200 (Tecan, Austria).

3.9 ANALISE DE MORFOLOGIA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

As células RAEC foram cultivadas em placas de 12 poços em condições normais de cultivo durante 2 e 24 horas. Após esse período o meio usual foi

substituído por meio sem SFB com a toxina nas concentrações de 20 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, em seguida células foram fotografadas em microscópio invertido Leica MPS30 (Leica Microscopy System Ltd., Heerbrugg, Switzerland). Experimentos feitos em duplicata. Como controle negativo foi, PBS foi adicionado no meio (mesmo volume de solução de toxina). O veneno total de *B. barnetti* também foi testado.

3.10 ENSAIO DE ADESÃO

Placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland) foram revestidas com 100 µl de fibronectina (10 µg/ml) ou BSA (10 mg/ml desnaturado por 10min a 85°C) em PBS à 4°C. Células RAEC coletadas de cultura próxima de confluência foram suspensas em meio F12 numa densidade de 4×10^5 células/ml. Uma amostra de 500µl da suspensão de células foi incubada com 500µl de meio com PBS ou diferentes concentrações de toxina diluídos em meio F12 por 2 ou 24h à 37°C. Após lavagem com meio, as células controles ou tratadas foram aplicadas nos poços previamente revestidos com o *coat* de fibronectina e incubados por 2h a 37°C para permitir adesão. Depois desse intervalo, as células não-aderidas foram cuidadosamente removidas por aspiração e lavadas com PBS. As células aderidas foram fixadas com metanol P.A. por 10 min e coradas com solução 0,5% de cristal violeta em metanol 20% por 20 min. Depois de exaustivas lavagens com PBS, o corante foi eluído com ácido cítrico 0,1M em etanol 50% para a estimativa do número de células aderidas. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 490nm pelo leitor MicroELISA (Bio-Rad, Madison, EUA).

3.11 PRODUÇÃO DE SORO ANTI-BAR-III

Para a produção dos soros anti Bar-III foram utilizados coelhos Nova Zelândia com peso por volta de 2 kg, fêmeas, provenientes de criadouro qualificado, com controle sanitário e zootécnico. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada entre 18°C e 22°C e com fornecimento de água e alimentação. Após coleta do soro pré-imune, os animais receberam injeções subcutâneas com volume final de 100 µL de uma emulsão de adjuvante completo de Freund e PBS (tampão fosfato 0,05 M pH 7.4 e 0,015 M de NaCl) contendo Bar-III,

utilizando massas variáveis e crescentes da toxina (Harlow, E, 2013), como mostrado na tabela 2. A partir da segunda imunização as emulsões foram preparadas com adjuvante incompleto de Freund. Todos os animais foram submetidos a quatro imunizações subsequentes realizadas em intervalos de 21 dias. Dez dias após a última imunização, o sangue dos animais foi coletado. O soro foi separado do sangue logo após a coleta por centrifugação a 3.000 RPM por 5 minutos e congelado à -20°C.

Os soros produzidos foram analisados por meio de ensaios de Western Blotting para averiguar sua capacidade de detecção *in vitro*.

TABELA 3 - PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO EM COELHOS, DEMONSTRANDO INTERVALO DE INOCULAÇÃO E DOSES CRESCENTES INOCULADAS DE BAR-III.

Tempo de inoculação	Concentração de Bar-III
Dia 1	5 µg
Dia 21	10 µg
Dia 42	25 µg
Dia 63	50 µg

3.12 ANÁLISE DE WESTERN BLOTTING

Após a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida, as proteínas presentes no veneno total da serpente *Bothrops barnetti* ou a Bar-III foram transferidas (método *semi-dry*) para membrana de nitrocelulose por 30 minutos a 25 Volts. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado diluído em PBS. O anticorpo primário anti-Bar-III (1:3.000) e o pré-imune foram diluídos na mesma solução de bloqueio e incubados com a membrana por 2 horas em temperatura ambiente, sob constante agitação. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com leite desnatado diluído em PBS, em seguida incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelhos conjugados com fosfatase alcalina (Sigma) (1:10.000) por uma hora em temperatura ambiente. Após lavagens, as membranas foram reveladas com o substrato BCIP e o cromógeno

NBT (Promega) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl 5 mM).

3.13 ANÁLISE DA LIGAÇÃO DA BAR-III NA SUPERFÍCIE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram soltas das garrafas e ressuspensas em meio de cultura (grupo controle) ou meio de cultura acrescido de Bar-III (50µg/mL) em uma densidade de 1×10^6 células/mL. As células foram mantidas em rotação por 30 minutos nas condições de cultivo. Alternativamente, as células foram incubadas com solução de anticorpo α -Bar-III junto de Bar-III pré-incubada previamente por 1 hora, para verificar a especificidade desses anticorpos (avaliar a hipótese de essa pré-incubação inviabilizar a ligação dos anticorpos α -Bar-III a Bar-III ligada na superfície celular). Após bloqueio com PBS/BSA 1% as células foram incubadas com anticorpos anti Bar-III (1:1000). Após 5 lavagens com PBS as células foram novamente incubadas com PBS/BSA 1% e posteriormente tratadas com anticorpo secundário anti-coelho marcado com alexa flúor 488 (Donkey anti-Rabbit IgG secondary antibody alexa flúor 488, Invitrogen, USA). Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra no citômetro de fluxo e os dados analisados.

Para análise de capacidade de interferência da ligação de anticorpos anti-integrina $\alpha 5$ à receptores integrina pela Bar-III, células foram sensibilizadas ou não com a Bar-III (50µg/mL). Após bloqueio com PBS/BSA 1% as células foram incubadas com anticorpos anti-integrina $\alpha 5$ (mouse monoclonal integrin alpha 5 antibody, Abcam USA) a uma diluição de 1:500 por 1 hora. Após 5 lavagens com PBS as células foram novamente incubadas com PBS/BSA 2% posteriormente tratadas com anticorpo secundário anti-coelho marcado com alexa flúor 488 (Donkey anti-mouse IgG secondary antibody alexa flúor 488, Invitrogen, USA), fixadas em paraformaldeído 2%. Posteriormente a quantificação da fluorescência foi mensurada no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, USA). Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de citotoxicidade foi analisado através do programa estatístico GraphPad Prism 6, utilizando a análise de variância (ANOVA - dupla sem repetição). Para a comparação entre os grupos tratados e controles foi utilizado o teste de Tukey que possibilitou comparar o nível de significância, sendo que os dados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes, utilizando ainda $p < 0,01$ ou $p < 0,001$.

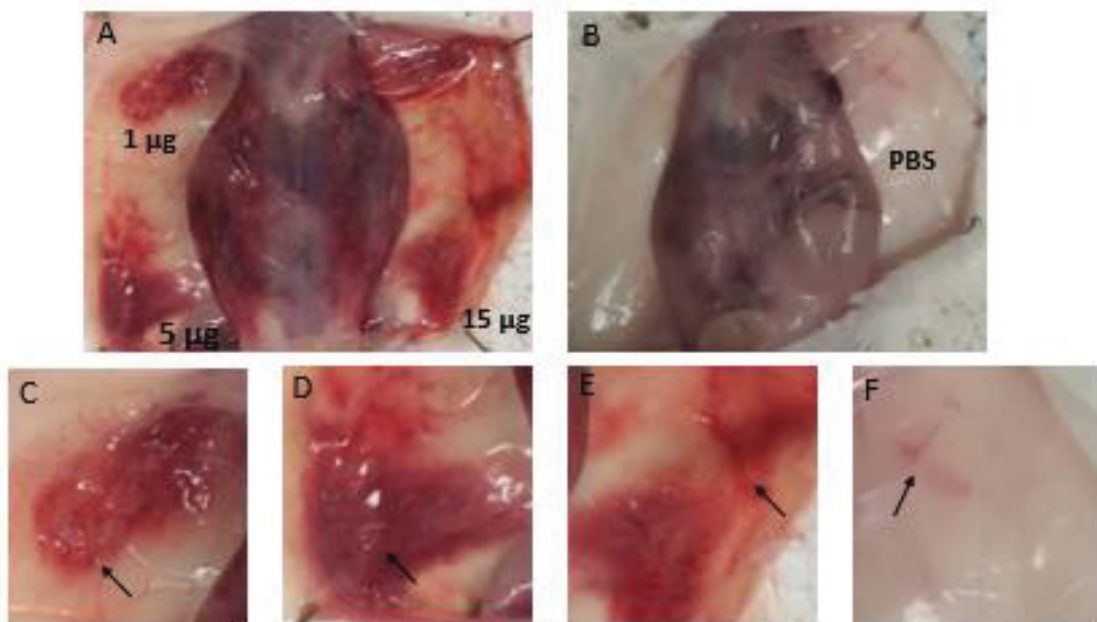
Para o teste de ligação da Bar-III foi usado programa estatístico GraphPad Prism 6 usando o teste t student comparando grupo de células com ou sem tratamento, avaliando nível de significância, sendo que os dados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes, utilizando ainda $p < 0,01$ ou $p < 0,001$.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA BAR-III EM CAMUNDONGOS

Metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs), são caracteristicamente descritas como moléculas com propriedades hemorrágicas. Para avaliar a capacidade da Bar-III em desencadear atividade hemorrágica *in vivo*, foi feito um teste injetando a Bar-III via subcutânea nas concentrações testadas partindo de 1 μg até 15 μg (Figura 7). O resultado mostra que essa molécula é capaz de desenvolver quadro hemorrágico local a partir da concentração de 1 μg , sendo que na concentração de 15 μg pode-se observar um espalhamento da hemorragia.

FIGURA 7- ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA BAR-III NA PELE DE CAMUNDONGOS APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO A BAR-III



(A) Exposição de pele de camundongo após aplicação via subcutânea da Bar-III, sendo observada atividade hemorrágica nas regiões da pele e peritônio do animal teste onde a toxina foi aplicada em diferentes quantidades (B) Exposição de pele de camundongo após a aplicação PBS (seta) (C), seta demonstrando local de aplicação da massa testada de 1 μg de Bar-III (D) seta demonstrando local de aplicação da massa testada de 5 μg de Bar-III (E) seta demonstrando local de aplicação da massa testada de 15 μg de Bar-III (F) Controle negativo (PBS), seta demonstrando local de aplicação. Injeção via subcutânea em camundongos da linhagem Swiss, animais foram eutanasiados e o folheto interno da pele foi observado 24 horas após sua inoculação. Imagens representativas de um $n=4$.

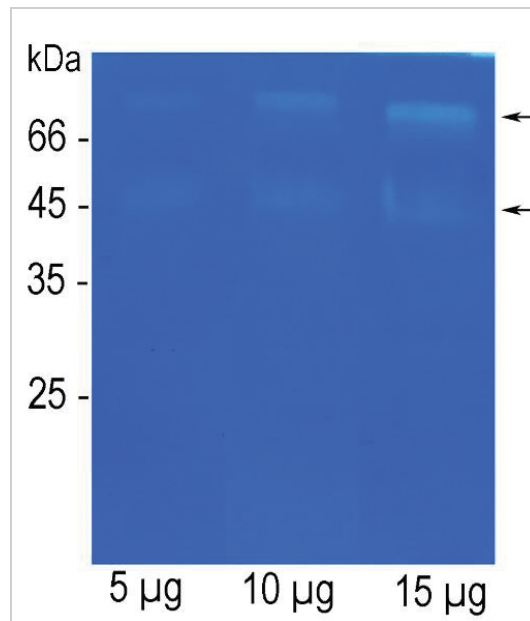
4.2 DEGRADAÇÃO DE MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

Nos testes de degradação a Bar-III apresentou atividade gelatinolítica, verificada no Zimograma co-polimerizado com 0,2% de gelatina, nas concentrações de 5 μg , 10 μg e 15 μg (Figura 8).

O corante Azul de Coomassie possui afinidade por proteínas e se liga onde elas estão presentes, as bandas brancas indicam lugares onde não há proteína, degradadas pela toxina, desta forma são regiões que não se coram, ao contrário do restante do gel onde a gelatina se manteve presente.

É possível observar ainda que a intensidade das bandas aumenta de acordo com a quantidade de Bar-III utilizada, indicando que quanto mais toxina presente, maior é a extensão da degradação. Apenas na concentração de 1 μg não foi possível observar essa atividade (dado não mostrado).

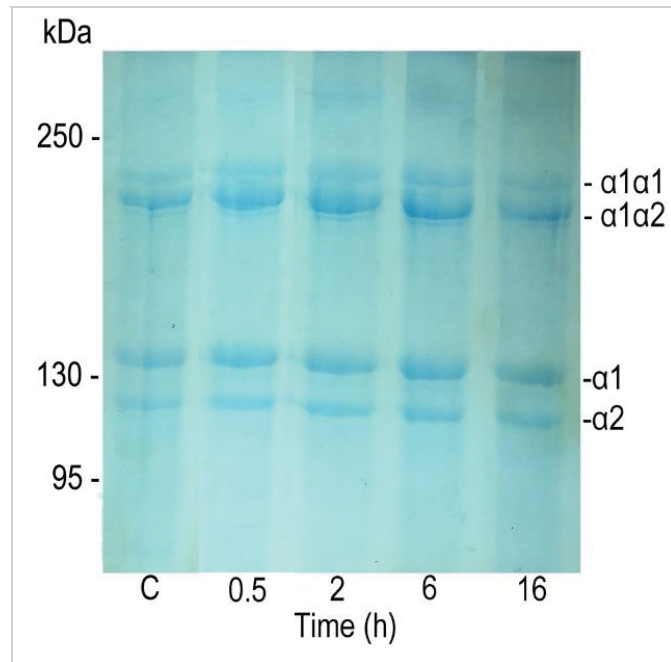
FIGURA 8- ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DA BAR –III



Zimograma SDS-Page 10%, no qual a toxina Bar – III, nas concentrações de 5µg, 10µg e 15µg, foi submetida à corrida eletroforética em gel co- polimerizado com 0,2% de gelatina, setas demonstram local de degradação de gelatina pela Bar-III.

No teste de cinética enzimática sobre Colágeno I, não foi visualizada degradação dessa molécula de MEC pela Bar-III (Figura 9). Já para colágeno I desnaturado (Figura 10), é possível observar o início da degradação em 30 minutos, e a partir do tempo 2 horas as bandas superiores começaram a desaparecer até que nos tempos de 6, 16 e 24 horas não aparecem mais bandas. Isso pode indicar uma degradação em fragmentos tão pequenos a ponto de não serem detectados no gel.

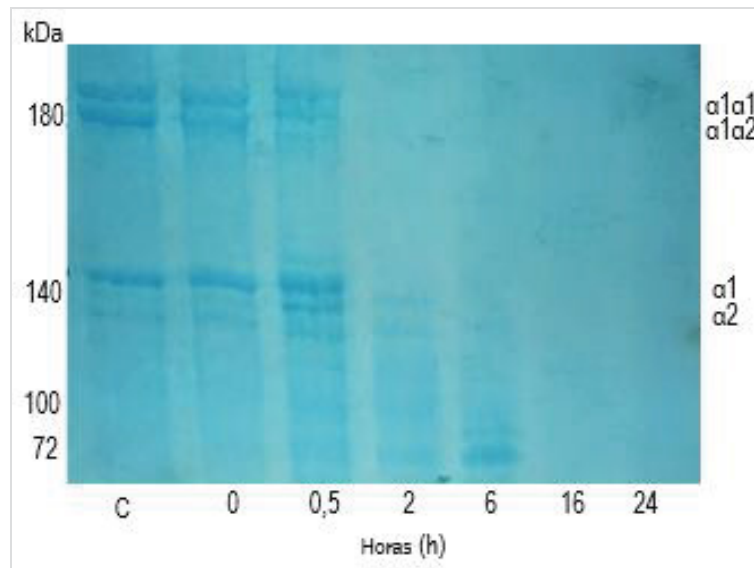
FIGURA 9- ATIVIDADE DA BAR- III PURIFICADA DO VENENO DE *B. BARNETTI* SOBRE COLÁGENO I



As amostras foram incubadas a 37°C durante diferentes intervalos de tempo com a enzima, na proporção de 1:50 (enzima:substrato). Amostras submetidas à corrida em SDS-PAGE 5% sob condições redutoras. (C) Controle experimental (Colágeno I incubado a 37°C por 24h). À esquerda da imagem estão descritas as posições dos marcadores de massa molecular, abaixo demonstrado o tempo em horas. À direita foram indicadas as cadeias $\alpha1\alpha1$ e $\alpha1\alpha2$ e cadeias isoladas $\alpha1$ e $\alpha2$ de colágeno I.

O aquecimento ao qual a molécula foi exposta antes da incubação com a toxina, é capaz de desorganizar sua estrutura de hélice tripla, expondo sítios que podem facilitar a interação e ação da toxina, como demonstrado em uma comparação visual entre os colágenos I *in natura* e colágeno I desnaturado.

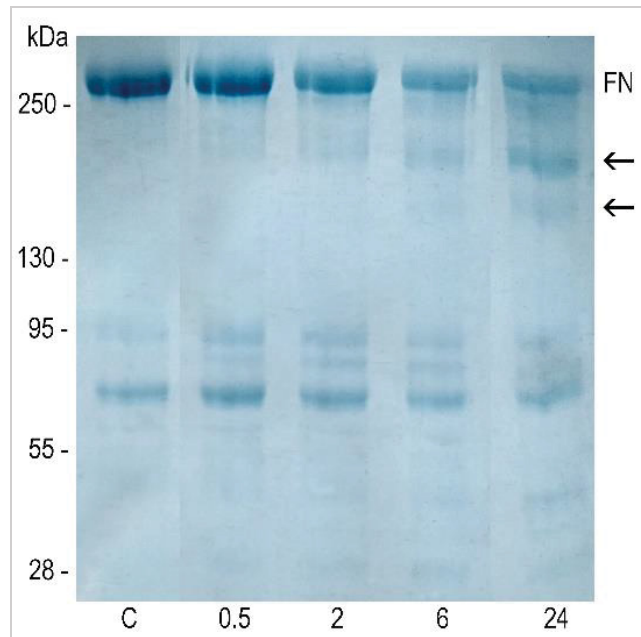
FIGURA 10- ATIVIDADE DA BAR -III SOBRE COLÁGENO I DESNATURADO:



As amostras foram incubadas a 37°C durante diferentes intervalos de tempo com a enzima, na proporção de 1:100 (enzima:substrato) após serem fervidas para desnaturar. Amostras submetidas à corrida em SDS-PAGE 5% sob condições redutoras. (C) Controle experimental (Colágeno I incubado a 37°C por 24h). À esquerda da imagem estão descritas as posições dos marcadores de massa molecular, abaixo demonstrado o tempo em horas. À direita foram indicadas as cadeias $\alpha1\alpha1$ e $\alpha1\alpha2$ e cadeias isoladas $\alpha1$ e $\alpha2$ de colágeno I.

No teste de cinética de degradação realizado com a Fibronectina (Figura 11) que é uma proteína extracelular multifuncional, tendo participação importante nos processos de adesão celular e no processo de coagulação, a Bar-III apresentou capacidade de degradar essa molécula, iniciando com 30 minutos de incubação e se acentuando ao longo dos tempos testados, como demonstrado pelo aumento do número de bandas em cada tempo.

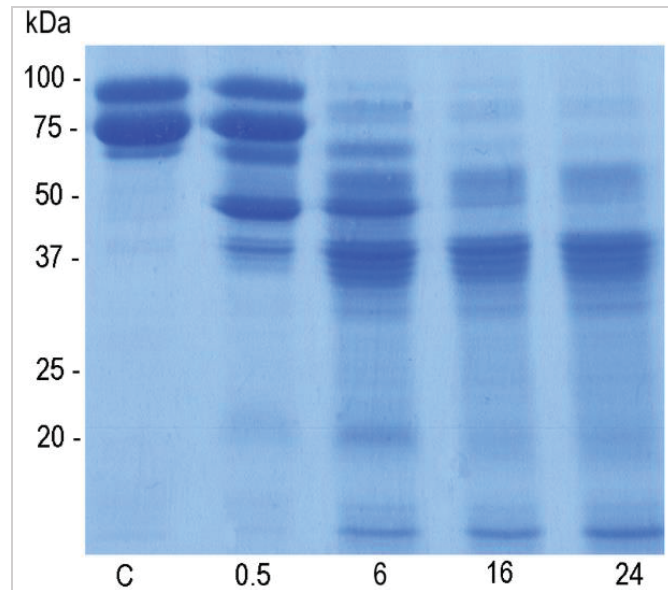
FIGURA 11- ATIVIDADE FIBRONECTINOLÍTICA DA BAR- III PURIFICADA DO VENENO DE *B. BARNETTI*:



As amostras foram incubadas a 37°C durante diferentes intervalos de tempo com a enzima, na proporção de 1:50 (enzima:substrato). Amostras submetidas à corrida em SDS-PAGE 7,5% sob condições redutoras. (C) Controle experimental (Fibronectina incubada a 37°C por 24h). À esquerda da imagem estão descritas as posições dos marcadores de massa molecular, abaixo demonstrado o tempo em horas. As setas indicam fragmentos de fibronectina resultantes da degradação pela Bar-III.

O ensaio de cinética de degradação sobre vitronectina (Figura 12) demonstrou uma alta capacidade da Bar-III em degradar essa molécula de MEC. No tempo de 30 minutos é possível observar considerável degradação, que se acentua com o passar dos tempos de exposição testados.

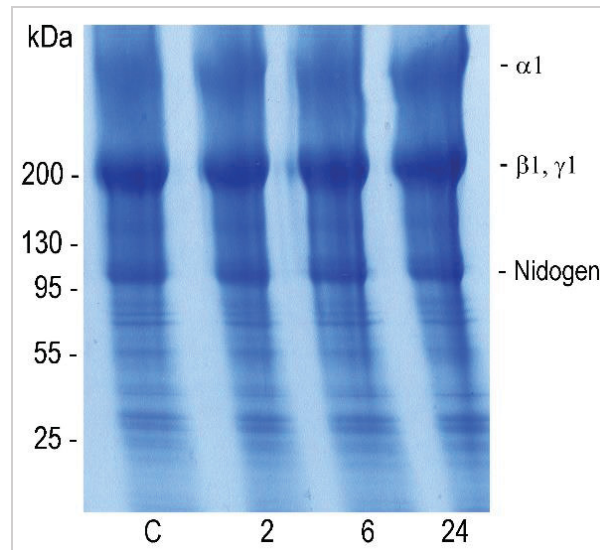
FIGURA 12- ATIVIDADE DA BAR- III PURIFICADA DO VENENO DE *B. BARNETTI* SOBRE VITRONECTINA



As amostras foram incubadas a 37°C durante diferentes intervalos de tempo com a enzima, na proporção de 1:100 (enzima:substrato). Amostras submetidas à corrida em SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras. (C) Controle experimental (Vitronectina incubada a 37°C por 24h). À esquerda da imagem estão descritas as posições dos marcadores de massa molecular, abaixo da imagem o tempo de exposição em horas.

Foi executado um teste de cinética de degradação sobre Laminina copurificada com nidogênio (Figura 13). Após os tempos de incubação a toxina não foi possível observar degradação tanto da laminina quanto do nidogênio, mantendo os padrões das moléculas após os tempos de exposição.

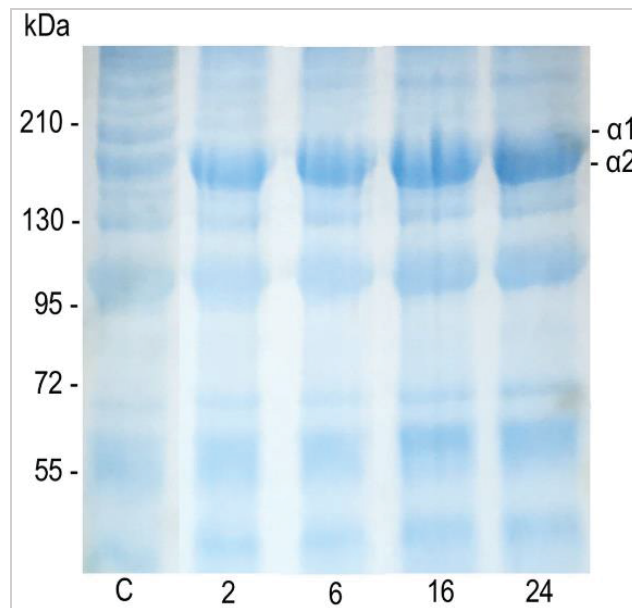
FIGURA 13- ATIVIDADE DA BAR- III PURIFICADA DO VENENO DE *B. BARNETTI* SOBRE LAMININA E ENTACTINA



As amostras foram incubadas a 37°C durante diferentes intervalos de tempo com a enzima, na proporção de 1:50 (enzima:substrato). Amostras submetidas à corrida em SDS-PAGE gradiente 3-20% sob condições redutoras. (C) Controle experimental (Laminina incubada a 37°C por 24h). À esquerda da imagem estão descritas as posições dos marcadores de massa molecular, abaixo demonstrado o tempo em horas. À direita foram indicadas as cadeias $\alpha 1$ e $\beta 1, \gamma 1$, além do nidogênio co-purificado com a laminina.

O ensaio de degradação de Colágeno IV pela Bar-III demonstrou um perfil de degradação de cadeias pesadas deste colágeno ($\alpha 1$), que, clivadas, possivelmente ficaram depositadas próximos a cadeia $\alpha 2$ do colágeno IV.

FIGURA 14- ATIVIDADE DA BAR- III PURIFICADA DO VENENO DE *B. BARNETTI* SOBRE COLÁGENO IV



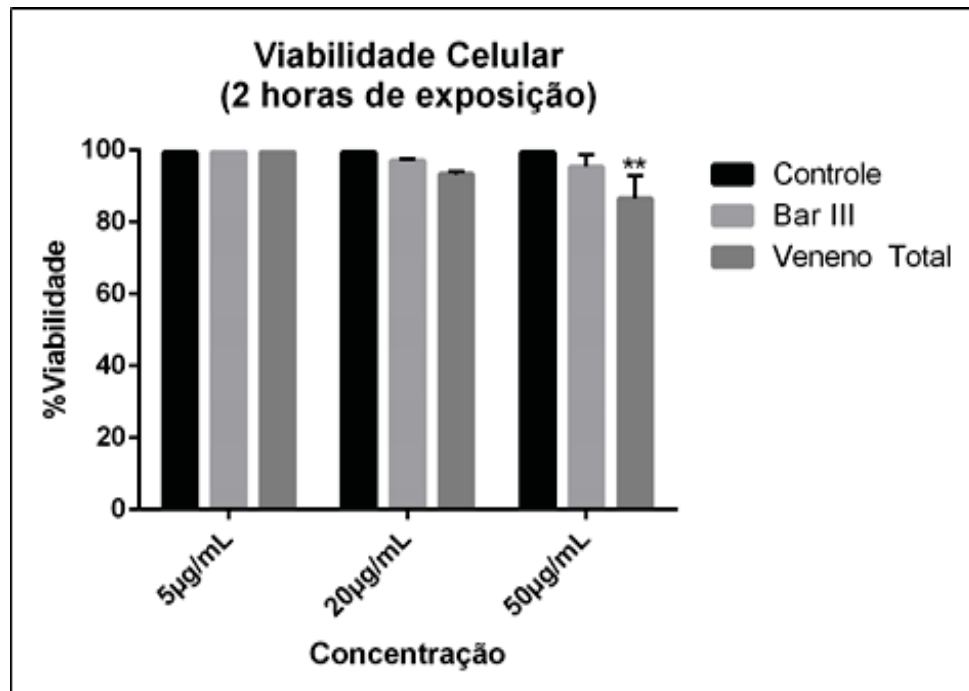
As amostras foram incubadas a 37°C durante diferentes intervalos de tempo com a enzima, na proporção de 1:50 (enzima:substrato). Amostras submetidas à corrida em SDS-PAGE 7,5% sob condições redutoras. (C) Controle experimental (Colágeno IV incubado a 25°C por 24h). À esquerda da imagem estão descritas as posições dos marcadores de massa molecular, abaixo demonstrado o tempo de exposição a Bar-III em horas. À direita foram indicadas as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ de colágeno IV.

4.3 EFEITO DA BAR-III SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Foi realizado o teste de viabilidade celular, pelo método de Azul de tripan que avalia integridade de membrana celular sendo uma forma de avaliar viabilidade e integridade das células. Os ensaios foram realizados com as células endoteliais da aorta de rato (RAEC) expostas às concentrações de 5 μ g/mL, 20 μ g/mL e 50 μ g/mL da Bar-III durante 2 horas (Gráfico 1) e 24 horas (Gráfico 2). Em ambos os tempos de exposição a toxina não diminuiu a viabilidade das células, comparado aos controles, independentemente das concentrações utilizadas.

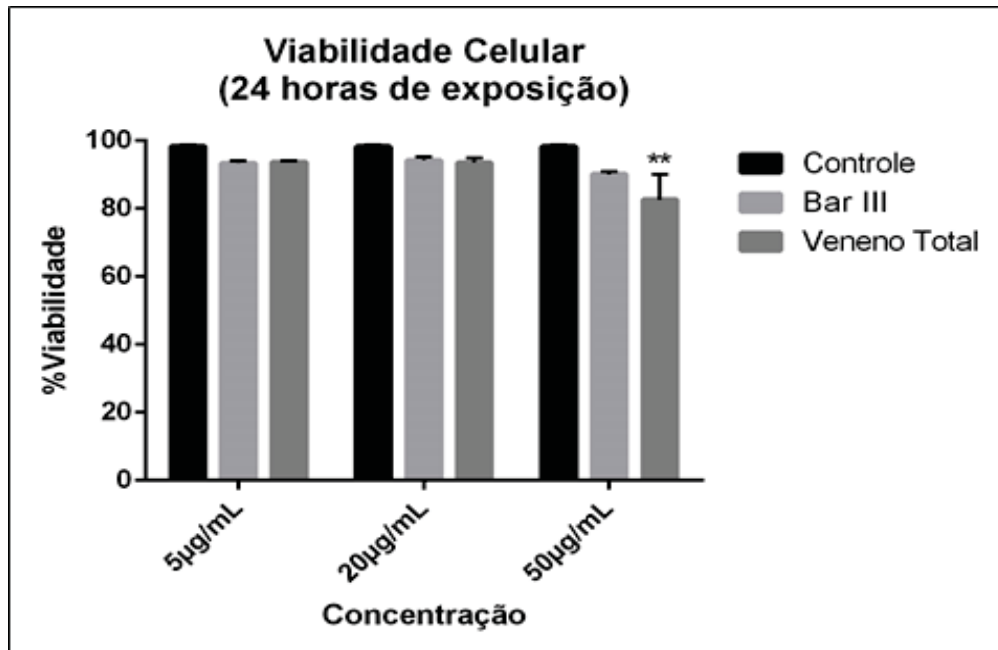
Houve alteração de viabilidade apenas quando as células foram expostas ao veneno total da *B. barnetti* em comparação ao controle negativo PBS, tanto após 2 horas como após 24 horas.

GRÁFICO 1- VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS RAEC FRENTE A EXPOSIÇÃO A BAR - III NO TEMPO DE 2 HORAS



A toxina e veneno total foram incubados com células RAEC nas concentrações de 5µg/mL, 20µg/mL e 50µg/mL e submetidos à teste de viabilidade celular pelo método de Azul de tripan. Controles PBS e Veneno total de *B. barnetti*. A significância foi determinada como **P < 0,01.

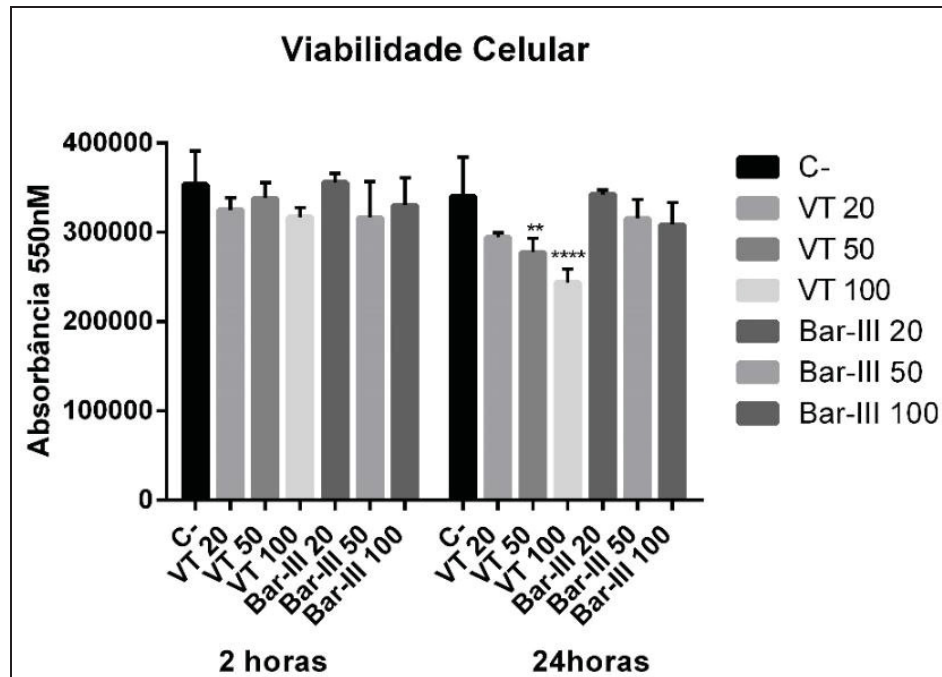
GRÁFICO 2 - VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS RAEC FRENTE A EXPOSIÇÃO A BAR - III NO TEMPO DE 24 HORAS



LEGENDA: A toxina foi incubada nas concentrações de 5 µg/mL, 20 µg/mL e 50 µg/mL e submetidos à teste de viabilidade celular pelo método de Azul de tripan. Controles PBS e Veneno total de *B. barnetti*. A significância foi determinada como *P <0,01.

Afim de complementar os ensaios de viabilidade, foi utilizado um método que pudesse avaliar a viabilidade por outra via celular. Para tanto, a viabilidade das células RAEC foi também avaliada pelo ensaio de quantificação de ATP por luminescência (Cell titer glo Kit® PROMEGA, USA) (Gráfico 3). A quantificação do ATP é diretamente proporcional ao número de células viáveis na amostra. As células não apresentaram redução significativa de viabilidade quando tratadas com a Bar-III em todas as concentrações (20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL) e tempos (2h e 24h) avaliados. Já as células tratadas com veneno total de *B. barnetti* apresentaram diminuição de viabilidade após 24 horas nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL.

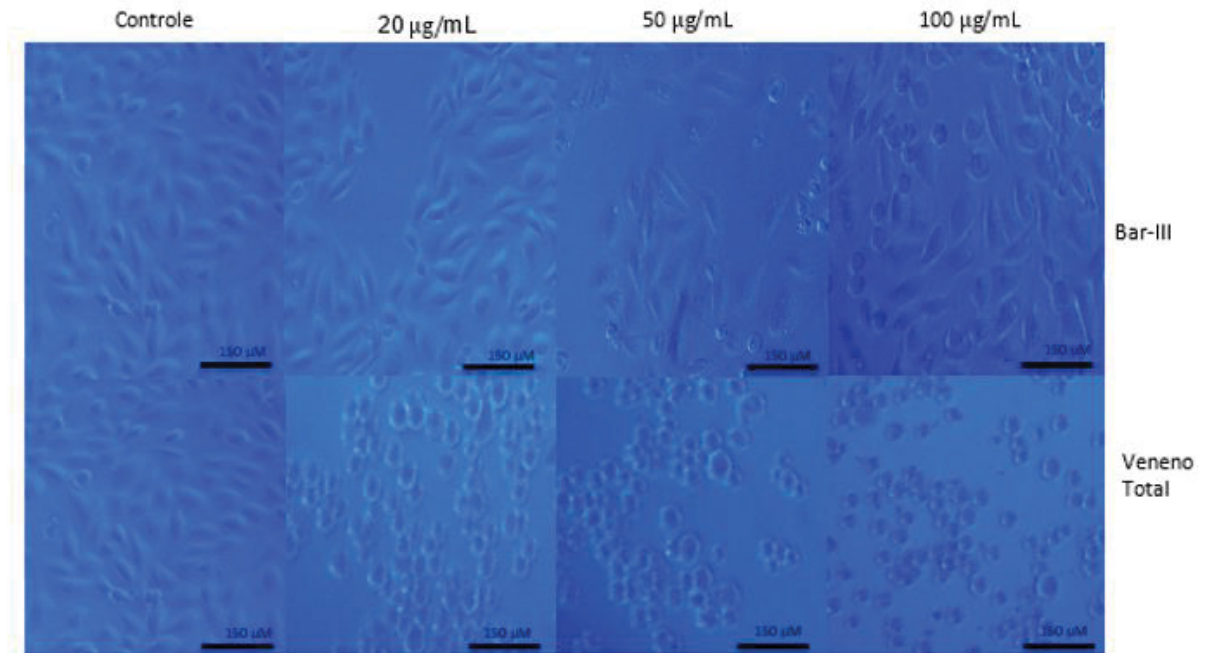
GRÁFICO 3- VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS RAEC FRENTE A EXPOSIÇÃO A BAR - III NOS TEMPOS DE 2 HORAS E 24 HORAS:



A toxina foi incubada nas concentrações de 20µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. Ensaio de viabilidade utilizando o kit Cell titer glo®. Controles PBS, e Veneno total de *B. barnetti*. comparado a Bar-III A significância foi determinada como *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

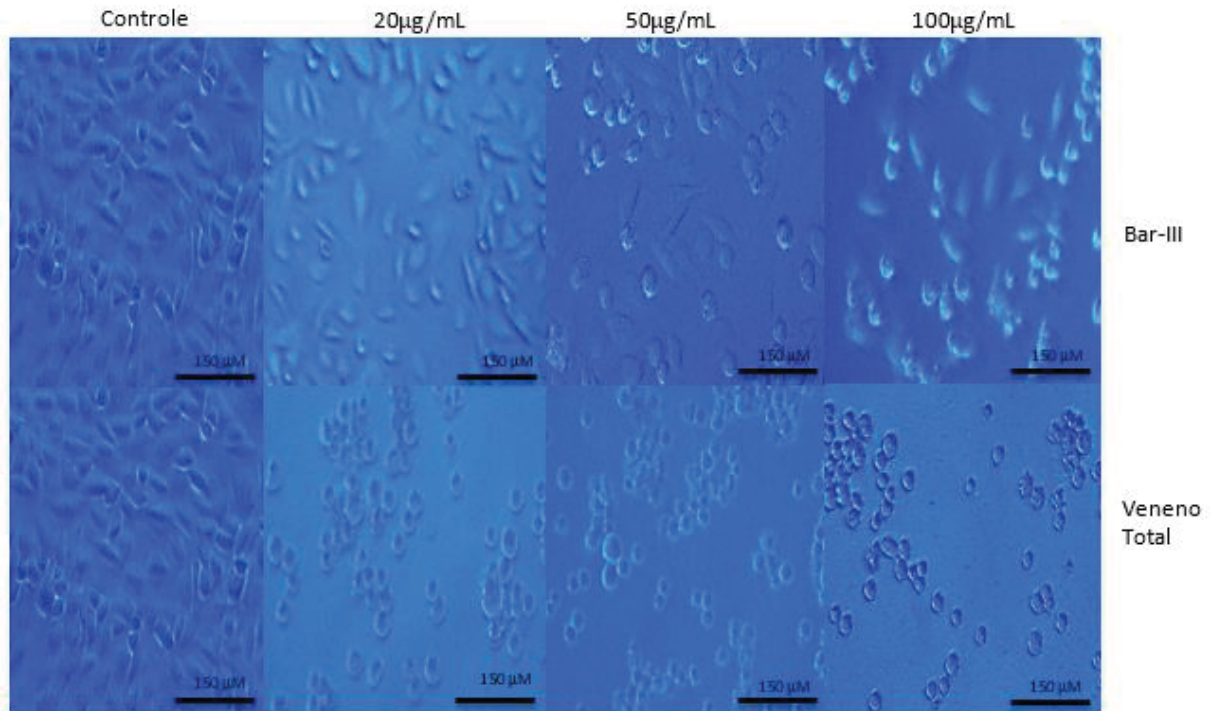
Para visualização de possíveis alterações morfológicas nas células RAEC decorrentes da ação da Bar-III e do veneno total, as células expostas ao veneno e à toxina foram fotografadas após os tempos de 2 horas de exposição (Figura 15) e 24 horas de exposição (Figura 16). Foram observadas alterações morfológicas significantes nas células RAEC expostas ao veneno total da *B. barnetti*, demonstrando atividade citotóxica sobre estas células. As células ficaram arredondadas, o que demonstra que elas estavam desaderindo da matriz extracelular. Essa desadesão se concretizou após 24 horas, quando a maior parte das células se encontrava suspensa no meio de cultura. Porém, quando expostas a Bar-III notam-se alterações morfológicas em algumas células, nas concentrações mais altas de Bar-III (50 µg/mL e 100 µg/mL) em 2 e 24 horas, mas ainda podem ser encontradas células com morfologia inalterada.

FIGURA 15- EFEITO DA BAR-III E VENENO TOTAL DE *B. BARNETTI* SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS APÓS 2 HORAS DE EXPOSIÇÃO:



Avaliação de alterações de morfologia de células RAEC tratadas com veneno total e Bar-III (concentrações de 20µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL). Controle com o volume de veneno/toxina substituído por PBS. Células fotografadas em microscópio invertido Leica MPS30 (Leica Microscopy System Ltd., Heerbrugg, Switzerland). (Aumento de 200X).

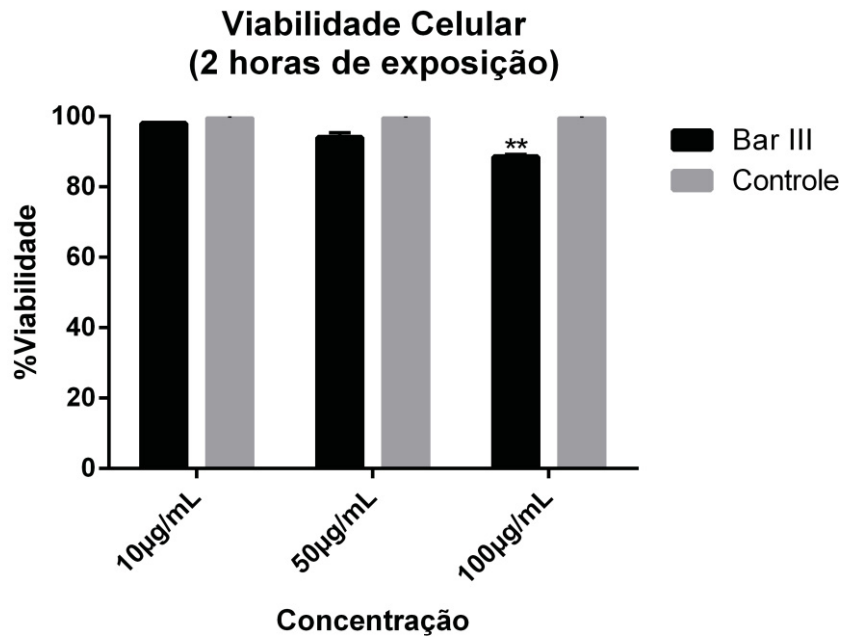
FIGURA 16- EFEITO DA BAR-III E VENENO TOTAL DE *B. BARNETTI* SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO



Avaliação de alterações de morfologia de células RAEC tratadas com veneno total e Bar-III (concentrações de 20µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL). Controle com o volume de veneno/toxina substituído por PBS. Células fotografadas em microscópio invertido Leica MPS30 (Leica Microscopy System Ltd., Heerbrugg, Switzerland). (Aumento de 200X).

Para avaliar a capacidade de interferência da ligação de células endoteliais pela Bar-III, levando em consideração sua possível capacidade de ligação à integrinas, foi executado um ensaio de adesão, no qual uma placa sensibilizada com Fibronectina, molécula de matriz extracelular caracteristicamente presente na matriz dessas células e sujeita a adesão por estas mesmas células, é exposta a células previamente tratadas com Bar-III por 2 horas. No entanto, antes desse teste, foi feito um teste de viabilidade com as células RAEC em suspensão por 2 horas (Gráfico 4), afim de demonstrar que esse tratamento não era capaz de alterar a viabilidade celular das células soltas nas concentrações de 20µg/mL e 50µg/mL.

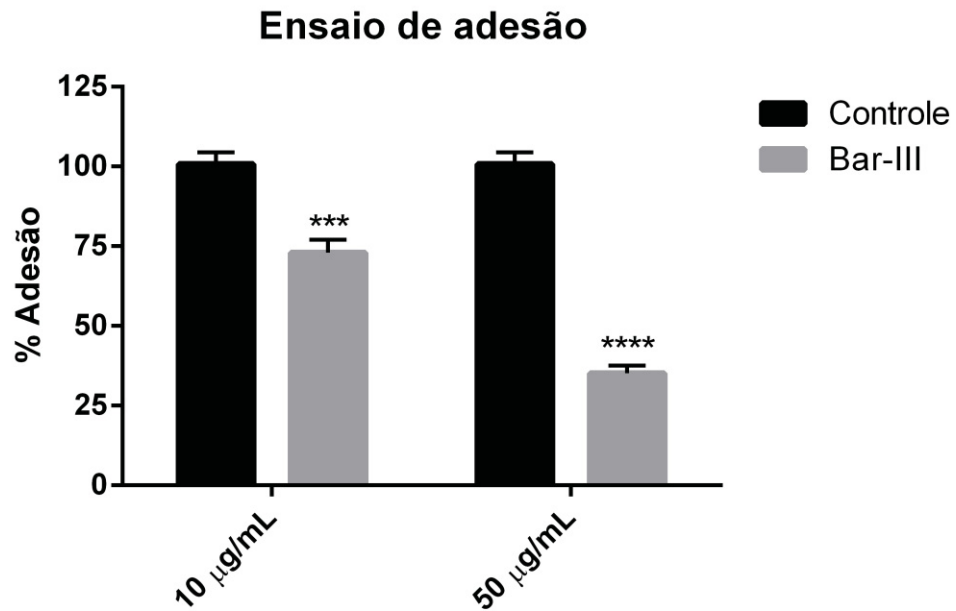
GRÁFICO 4 - VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS RAEC SOLTAS FRENTE A EXPOSIÇÃO A BAR - III NOS TEMPOS DE 2 HORAS



A toxina foi incubada com as células em suspensão nas concentrações de 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Controle PBS, comparado a Bar-III, a significância foi determinada como $**P < 0,01$.

Após o teste anterior, foi testada a capacidade de interferência da Bar-III (em concentrações que não alteram viabilidade celular) na adesão de células endoteliais à fibronectina. Como mostra o Gráfico 5, a pré-incubação das células com a Bar-III diminuiu a adesão das RAEC à fibronectina.

GRÁFICO 5- ADESÃO CELULAR DE CÉLULAS RAEC EM PLACA SENSIBILIZADA COM FIBRONECTINA APÓS EXPOSIÇÃO A BAR - III POR 2 HORAS

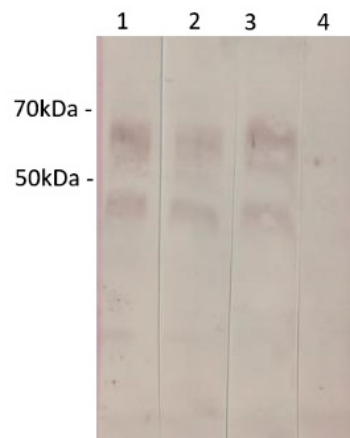


A toxina foi incubada com as células nas concentrações de 10µg/mL e 50µg/mL. Controles PBS, comparados à Bar-III. A significância foi determinada como *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

Adicionalmente, foram produzidos anticorpos policlonais anti-Bar-III em coelhos, afim de usá-los como bioferramentas para outros testes. A capacidade de ligação desses anticorpos foi testada via *western blot*, sendo primeiramente testado contra Bar-III, afim de avaliar sua capacidade de reconhecimento e títulos com reações positivas. Como pode ser observado na Figura 17, o soro se mostrou eficaz em todas as diluições testadas (1:3000, 1:5000, 1:10000).

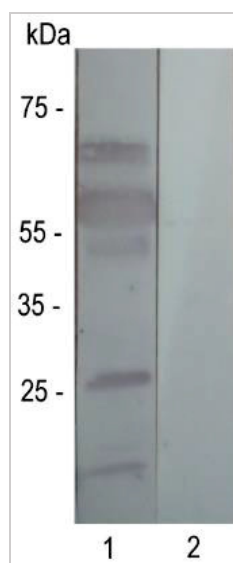
Em seguida o soro anti-Bar-III foi testado contra o veneno total de *B. barnetti*. A figura 18 mostra o reconhecimento de uma banda proeminente na altura de cerca de 60 kDa, e de outras bandas menos notáveis correspondentes à diversas proteínas do veneno. Esse reconhecimento foi possível com uma diluição do soro policlonal de 1:3000, demonstrando assim eficácia do soro em detectar a bar-III *in vitro*, e validando seu uso para testes posteriores.

FIGURA 17- IMUNODETECÇÃO DA BAR-III PURIFICADA POR ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-BAR-III GERADOS EM COELHO



Reconhecimento de 2 μ g de Bar-III por anticorpos policlonais do soro de coelhos imunizados com Bar-III. Observa-se reconhecimento nas colunas (1) 1:3.000, (2) 1: 5.000 e (3) 1:10.000(diluições do soro policlonal anti-Bar-III), em todas as diluições foram observadas duas bandas, indicadas pelas setas a direita. Como controle, não houve reconhecimento pelo soro pré-imune (coluna 4).

FIGURA 18- IMUNODETECÇÃO DE VENENO DE *B. BARNETTI* POR ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-BAR-III.

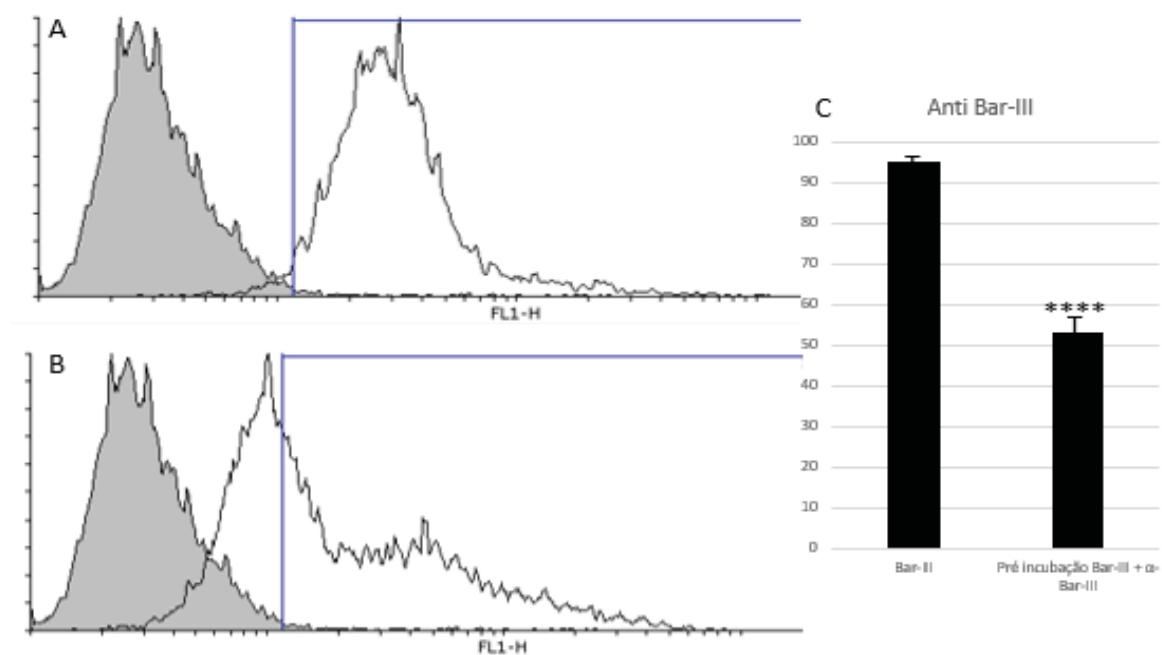


(1) antissoro produzido em coelhos utilizando Bar-III como antígeno, demonstrando o reconhecimento de uma banda mais proeminente em 60 kDa e de outras proteínas do veneno de *Bothrops barnetti*. Resumidamente, 2 μ g de veneno foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE 10% sobre condições redutoras. A coluna 1 mostra a reação com antissoro contra Bar-III (1:3000). (2) Controle de especificidade do anticorpo na presença de soro pré-imune do Coelho (1:3000).

Foi avaliada a capacidade de ligação da Bar-III sobre a superfície de células endoteliais através do método de imunomarcagem e quantificação da marcação por citometria de fluxo (Figura 19). Foram feitas incubações por 30 minutos de células

com a Bar-III em concentrações que não alteram viabilidade celular e posterior incubação com anticorpo anti-Bar-III. Nesse caso, 95% das células dos 10.000 eventos testados estavam marcadas. O teste com as células expostas à Bar-III e incubadas com solução de pré incubação do anticorpo α -bar-III com a bar-III purificada (e não com somente anti-Bar-III), apresentou 53,1% das células marcadas, demonstrando diminuição estatisticamente significativa de fluorescência quando comparada a incubação direta com anti-Bar-III. É possível que esse ensaio de competição não tenha diminuído mais a marcação das células pois houve excesso de anticorpo na pré-incubação com a toxina. De qualquer maneira, esse resultado indica que reconhecimento da Bar-III pelo anticorpo policlonal é, em grande parte, específico.

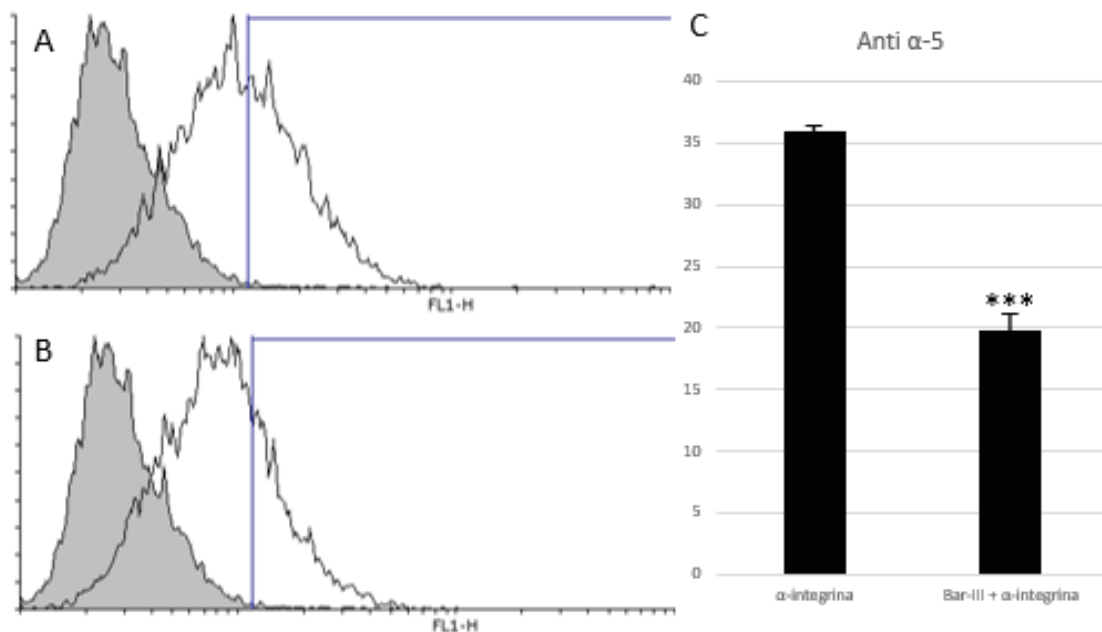
FIGURA 19- CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA BAR-III SOBRE CÉLULAS RAEC ANALISADA POR CITOMETRIA DE FLUXO



LEGENDA: Amostras foram marcadas com anticorpo policlonal anti Bar-III que foi reconhecido por anticorpo anti IgG de coelho conjugado com alexa 488 (A) histograma cinza indica controle de fluorescência basal com anticorpo secundário, histograma branco representa as células tratadas com Bar-III e marcadas com anticorpo, no qual 95% da células foram consideradas marcadas, (B) histograma cinza indica controle de fluorescência basal com anticorpo secundário, histograma branco é um ensaio de competição de antígeno, pré incubação de anticorpo anti bar-III com a bar-III, solução incubada com células RAEC exposta à Bar-III, demonstrando 53,1% consideradas marcadas como mostrado no gráfico em C (significância de **** $P < 0,0001$).

Para avaliar a capacidade de ligação da Bar-III em integrinas $\alpha 5$ presentes na superfície de células endoteliais por meio de citometria de fluxo (Figura 20), as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti integrina $\alpha 5$ (mouse monoclonal integrin alpha 5 antibody, abcam USA). Cerca de 35% das células foram consideradas marcadas, já o teste com células expostas a Bar-III por 30 minutos e em seguida expostas integrinas $\alpha 5$ demonstrou apenas 19,7% de células consideradas marcadas, diminuição estatisticamente significativa de fluorescência quando comparada a incubação sem o tratamento com a Bar-III. Isso indica que, nesse ensaio (figura 20 B) parte dos sítios de ligação dos anticorpos anti integrina $\alpha 5$ estavam ligados à Bar-III.

FIGURA 20- CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA BAR-III SOBRE INTEGRINAS A5 DE CÉLULAS RAEC ANALISADA POR CITOMETRIA DE FLUXO



Amostras foram marcadas com anticorpo monoclonal anti- $\alpha 5$ que foi reconhecido por anticorpo anti IgG de camundongo conjugado com alexa 488 (A) histograma cinza indica controle de fluorescência basal com anticorpo secundário, histograma branco representa as células marcadas com anticorpo anti- $\alpha 5$, nesse caso 35,1% da células foram consideradas marcadas, (B) histograma cinza indica controle de fluorescência basal com anticorpo secundário, histograma branco são células RAEC, expostas à Bar-III seguida de incubação com anticorpo anti- $\alpha 5$ reconhecida por anticorpo secundário contra IgG de camundongo, demonstrando 19,7% consideradas marcadas, como demonstrado no gráfico em C (significância de $***P < 0,001$).

5 DISCUSSÃO

Venenos de serpentes são misturas complexas compostas por centenas de moléculas ativas, sendo encontrados nestes venenos componentes minerais e orgânicos, pequenos peptídeos e proteínas, que desencadeiam os efeitos do envenenamento (CALVETE et al., 2005). Podem ser encontrados componentes tóxicos que são capazes de atuar de maneira sinérgica ou individual, exibindo efeitos sobre seres humanos e modelos animais experimentais (SANCHEZ et al., 2003).

Com a análise proteômica do veneno de *Bothrops barnetti* feita por Koholhof e colaboradores em 2012, foi descrita a presença de uma grande diversidade de moléculas componentes neste veneno, entre elas, desintegrinas, fosfolipases A2, serino proteases, lectinas do tipo-C, L-amino-ácido oxidases e metaloproteases de veneno de serpente (SVMP). Neste estudo foi constatada uma predominância de moléculas do tipo SVMP pertencentes à classe PIII no veneno de *B. barnetti* (51,2% de sua composição). Uma dessas SVMPs de classe P-III foi purificada e denominada barnettlisina-III (Bar-III).

Uma das características mais conhecidas e graves em casos de envenenamento botrópico está relacionada à atividade de SVMPs sobre endotélio vascular, sendo que este efeito está relacionado com sua atividade catalítica que resulta na degradação de proteínas, uma vez que na presença de agente quelante sua atividade é inibida (CHOUDHURY et al, 2018; BORKOW et al., 1997; HOWES et al., 2007; MAZZI et al., 2004) . As SVMPs das três classes possuem em comum o seu domínio catalítico com ação enzimática similar entre elas. No entanto as toxinas de classe P-III são usualmente descritas com maior capacidade hemorrágica, sugerindo assim que outros domínios não catalíticos (domínios tipo desintegrina e domínio rico em cisteína) presentes nessas SVMPs possam ter participação nesta maior atividade. (JIA et al., 1997; RUCAVADO et al 2000; BALDO et al., 2010)

Por isso, foi testada a capacidade de, *in vivo*, a Bar-III produzir o efeito hemorrágico característico de serpentes da família viperidae. Após inoculação em camundongos via subcutânea da Bar-III em diferentes quantidades, notou-se atividade hemorrágica local após 24 horas de exposição. Além disso é possível observar alterações hemorrágicas na região peritoneal dos animais expostos a Bar-III isolada. Os resultados de hemorragia *in vivo* apresentados aqui sugerem que a

Bar-III acessou a corrente sanguínea do animal, pois foi mantida no organismo dos camundongos por 24 horas, demonstrando que houve o aparecimento do quadro hemorrágico sistêmico, o que corrobora com os dados apresentados por Escalante et al, 2003, que mostram sangramento pulmonar após inoculação intravenosa de jararagina (SVMP da classe P-III) em camundongos, após 15 minutos na corrente sanguínea. Os autores sugerem que essa hemorragia intensa está relacionada à suscetibilidade microvascular intrínseca às SVMPs, apresentando assim sangramentos nas unidades de alvéolo capilar (ESCALANTE et al, 2003).

Uma vez que o potencial hemorrágico de toxinas pode estar associado à sua atividade gelatinolítica (ROODT et al., 2003) esta propriedade foi avaliada com a utilização da Bar-III em um teste de zimografia de gelatina, uma forma de colágeno desnaturado. A toxina apresentou atividade gelatinolítica nesse ensaio de forma dose dependente. Este método representa de forma parcial a proteólise de colágeno a qual pode estar relacionada à degradação da matriz *in vivo* (TERRA et al., 2009). A atividade da Bar-III sobre colágeno I desnaturado foi observada em SDS-PAGE após a incubação com a toxina por diferentes intervalos, o que corrobora com a degradação observada no zimograma. A degradação do colágeno I *in natura*, por sua vez, não foi observada em um ensaio semelhante. O colágeno I desempenha um papel central no processo de agregação plaquetária e estabilidade da MEC (MOURA-DA-SILVA et al, 2008). De qualquer forma, não é possível excluir a hipótese de que esteja havendo ligação da Bar-III ao colágeno-I. Já foi demonstrado que a interação entre uma SVMP e colágeno I, mesmo sem degradação, pode também desencadear atividades hemorrágicas. Já foi descrito que a ligação de SVMPs com essa molécula interfere na ligação do colágeno I a integrinas $\alpha_2\beta_1$, levando ao enfraquecimento de capilares e contribuindo para o desenvolvimento de hemorragia. (MOURA-DA-SILVA et al, 2008; DE LUCA et al, 1996; KAMIGUTI e HAY, 1996).

Outra importante molécula de Matriz extracelular é a fibronectina. Essa glicoproteína participa de diversos processos celulares, entre eles, migração e adesão celular, além de ter papel fundamental em processos fisiológicos como embriogênese, cicatrização e hemostasia. A Bar-III demonstrou capacidade de degradação parcial *in vitro* de fibronectina plasmática. É sabido que a fibronectina plasmática se liga à cadeia A α do fibrinogênio e faz ligação cruzada com a fibrina. Fibrinogênio e fibrina têm atuação direta em eventos de coagulação sanguínea e

cicatrização (MARTIN e TIMPL, 1987; RUOSLATHI, 1988; MOSESSON, 2005). A fibronectina é comumente degradada por SVMPs *in vitro*, sendo encontrados em análises proteômicas de exsudatos de tecidos tratados com essas toxinas produtos de hidrólise de fibronectina de matriz extracelular e fibronectina plasmática (HERRERA et al, 2015; ESCALANTE, 2009). Os autores discutem que a presença desta fibronectina plasmática provavelmente ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular após a exposição a SVMPs.

Na matriz extracelular a fibronectina interage com receptores de superfície celular e outros componentes de matriz (Pickford e Campbell, 2004). A sua ligação com integrinas de plaquetas (α IIb β 3, α v β 3 e α 5 β 1) já é bem descrita (NGUYEN et al., 2018). Diversas metaloproteases hemorrágicas e não hemorrágicas são capazes de alterar os mecanismos de adesão e agregação plaquetária. A leucurolisina-A de *B. leucurus*, L4 de *Agkistrodon halys brevicaudus* e a lebetase de *Vipera lebetina* inibem a agregação plaquetária induzida por ADP. Como a ligação da fibronectina às integrinas de plaquetas ocorre pelo domínio RGD dessa molécula de matriz extracelular, é possível que desintegrinas e domínios semelhantes à desintegrina das SVMPs atuem competindo com essa ligação, o que levaria à inibição da agregação plaquetária. No entanto, SVMP de classe P-I, como a leucurolisina-A, não têm domínio desintegrina, então é possível que a inibição da agregação plaquetária por essas toxinas decorra de sua atividade de degradação sobre a fibronectina e fibrinogênio. Sendo assim, é possível sugerir que a Bar-III possa atuar inibindo a agregação plaquetária por degradar a fibronectina, impedindo a sua ligação à integrinas de plaquetas. Além disso, os resultados apresentados aqui mostram que a Bar-III também degrada vitronectina, outra proteína plasmática que têm um papel importante nos mecanismos de adesão e agregação plaquetária (ASCH e PODACK, 1990; GAWAZ et al., 1997).

Sabe-se que os processos de desestruturação da lâmina basal e enfraquecimento de capilares podem gerar o processo de hemorragia. Portanto, a degradação de moléculas características da lâmina basal pode interferir na estabilidade dos capilares. Entre essas moléculas estão o colágeno IV, a laminina e a entactina (KALLUR, 2003), sendo comumente descritas SVMPs capazes de degradar esses componentes (ESCALANTE et al, 2009; RUCAVADO et al, 2011; ESCALANTE et al, 2015; HERRERA et al 2016).

Particularmente, o colágeno IV é central na manutenção da estabilidade mecânica da membrana basal devido à formação de ligações covalentes entre eles e com várias outras moléculas de matriz extracelular, formando redes supramoleculares que influenciam a adesão, migração e diferenciação celular (KHOSHNOODI, 2008). Além disso é também descrito que modificações genéticas que alterem o colágeno IV podem gerar alterações vasculares e acidentes vasculares hemorrágicos (GOULD et al, 2005; FEDERICO et al, 2012). Diversos trabalhos mostram que SVMPs hemorrágicas são capazes de hidrolisar colágeno IV *in vitro* (HERRERA et al, 2015; FREITAS-DE-SOUZA et al 2017; BALDO et al 2010). Portanto, juntos, esses achados sugerem fortemente que a habilidade das SVMPs de induzir hemorragia está relacionada com a sua capacidade de hidrolisar colágeno IV (GUTIÉRREZ et al., 2016). A molécula Bar-III demonstrou capacidade de degradação *in vitro* de cadeias $\alpha 1$ de colágeno IV, mas não sobre a $\alpha 2$. Essa hidrólise de colágeno IV pode interferir nas interações entre moléculas da membrana basal e da matriz intersticial e também dessas moléculas com as células endoteliais, gerando um dano microvascular que culmina na hemorragia desencadeada por essa toxina.

Há também descrita a capacidade de algumas SVMPs em degradar outro componente de membrana basal, a laminina, essa geralmente encontrada na ligação entre derme e epiderme, sendo característica por gerar lesões na pele (KIRITSI et al, 2013; ESCALANTE et al, 2009). No entanto, a Bar-III não foi capaz de degradar laminina *in vitro*, mesmo após longo intervalo de incubação (24 horas). A Bar-III também não foi capaz de degradar nidogênio/entactina *in vitro*, molécula que forma pontes entre laminina e a rede de colágeno IV (KALLURI, 2003). De qualquer maneira, Gutiérrez e colaboradores (2016) elencam a hidrólise do colágeno IV e do core proteico do proteoglicano de heparan sulfato (HSPG, também conhecido como perlecan, outro componente das membranas basais), como etapa crítica para o desencadeamento do dano microvascular e hemorragia, pode-se sugerir que essa atividade dessa toxina esteja também relacionada com os danos hemorrágicos característicos do envenenamento por serpentes *B. barnetti*.

Observações ultraestruturais de células endoteliais de tecidos tratados com SVMPs mostram alterações patológicas proeminentes nessas células. Esse dano notável nas células endoteliais está associado à hemorragia de capilares *in vivo* (GUTIERREZ et al., 2005). O efeito direto das SVMPs sobre células endoteliais tem

sido investigado em estudos que utilizam cultura de células (OBRIG et al., 1993; BORKOW et al., 1995; WU et al., 2001). Os resultados, em geral, mostram que várias linhagens de células endoteliais são altamente resistentes ao tratamento com diversas SVMPs. O efeito mais notável é o destacamento dessas células do seu substrato, um efeito que é dependente da atividade proteolítica dessas toxinas (BORKOW et al., 1995). A apoptose das células endoteliais tratada com SVMPs é normalmente por *anoikis* (apoptose induzida por destacamento do seu substrato) (DIAZ et al., 2005), com algumas exceções (WU e HUANG, 2003).

Visando avaliar a possibilidade da Bar-III ter atividade direta sobre células endoteliais, foram executados testes de viabilidade celular em células endoteliais de aorta de coelho em cultura (RAEC) aderidas em seu substrato, um deles avaliando a integridade da membrana celular e o outro avaliando sua capacidade metabólica (capacidade de manutenção de produção de ATP). Pelos resultados destes testes, notou-se que a Bar-III isolada não teve atividade citotóxica sobre essa linhagem celular após 2 e 24 horas de exposição. O tratamento com o veneno total de *B. barnetti*, no entanto, apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com a variável de células não tratadas a partir da concentração de 50µg/mL de veneno após 24 horas de exposição pelos dois métodos. Embora no teste de azul de tripan, o qual avalia integridade da membrana plasmática das células, tenha sido observada diminuição da viabilidade celular na maior concentração testada com 2 horas de exposição, esse mesmo efeito não foi observado quando a viabilidade foi testada pela quantificação da produção de ATP na célula (testado pelo método de luminescência). Esse resultado corrobora com outros estudos que demonstram a resistência de células endoteliais ao tratamento com SVMPs purificadas, como descrito há pouco.

Células endoteliais em cultura, mesmo não sendo susceptíveis à alteração de viabilidade quando expostas à diversas SVMPs, podem alterar a sua morfologia e conseqüentemente se destacarem do seu substrato (Borkow et al, 1994). Nossos resultados mostram que, quando expostas ao veneno total de *B. barnetti*, as células endoteliais em cultura mostraram morfologia alterada após 2 horas de exposição já na menor concentração utilizada para os testes. Isso indica que, nessas condições o veneno total é capaz de diminuir a interação das células com a matriz extracelular produzida por elas, resultando na visível mudança de morfologia e destacamento das células. Essa diminuição da interação das células com a matriz extracelular

provavelmente decorre da ação de proteases do veneno que degradam componentes dessa matriz. É possível, também, que algumas toxinas do veneno atuem diretamente sobre as células já nas primeiras duas horas provocando citotoxicidade, a qual se manifesta inicialmente através das mudanças morfológicas observadas. No tempo de exposição de 24 horas e na maior concentração testada, o veneno total apresentou, além da alteração da morfologia e destacamento, uma visível diminuição no número de células observadas, corroborando com os resultados de citotoxicidade aqui apresentados que evidenciam essa diminuição da viabilidade frente ao veneno total. Esses resultados são comumente observados quando células em cultura são incubadas com venenos de serpente, uma vez que as células se desprendem devido a clivagem das proteínas do substrato das culturas celulares (BORKOW et al, 1995; RUCAVADO et al, 1995). Porém, quando as células foram expostas a Bar-III isolada, nota-se apenas um leve arredondamento das células observado somente após 24 horas de exposição e na maior concentração testada. Nesse tempo muitas células ainda mantêm sua morfologia inalterada, mas algumas delas apresentam-se com essa morfologia diferente, isto é, mais arredondadas, porém ainda não destacadas do substrato. Esses resultados demonstram uma atividade citotóxica do veneno total mais intensa quando comparada com a Bar-III isolada. Essa diferença confirma o que muitos autores defendem sobre a ação sinérgica dos componentes tóxicos presentes nos venenos de serpente e como isso pode aumentar o seu potencial de causar danos teciduais (CALVETE et al., 2005). Já a Bar-III, embora tenha demonstrado ser capaz de hidrolisar importantes componentes de matriz extracelular, tais como fibronectina e colágeno IV, possui limitações para que sua atividade ocorra sobre um complexo dessas proteínas quando esta é testada de maneira isolada.

Danos a células endoteliais são geralmente documentados mais proeminentes e mais rápidos (podendo ser vistos em poucos minutos) em relação aos testes *in vitro*, que podem demorar horas para demonstrar atividade (RUCAVADO et al, 1995; BORKOW et al, 1995; WU et al, 2001). BALDO et al (2015) discute que o uso de cultura de células endoteliais em monocamadas como modelo para investigar atividade de SVMPs hemorrágicas tem como falha o fato de fenotipicamente essas células estarem organizadas de maneiras diferentes *in vivo*. Além disso essa discrepância pode ocorrer devido a força da circulação sanguínea presente *in vivo*, criando tensão e estresse, acelerando o dano a células endoteliais

e desarranjo da membrana basal próxima ao endotélio (GUTIERREZ et al, 2005; BALLERMANN et al, 1988). Foi proposto por Gutierrez *et al*(2005) que os danos causados a microvasculatura capilar causado por SVMPs hemorrágicas ocorrem em duas etapas, sendo que inicialmente SVMPs hidrolisam substratos chave de membrana basal ao redor de células endoteliais em capilares, enfraquecendo a estabilidade mecânica da membrana basal e aumentando a distensibilidade da parede microvascular, e numa segunda etapa, forças hemodinâmicas que atuam na microcirculação, em especial as forças hidrostáticas, induzem uma distensão e eventual rompimento da parede vascular ocasionando o extravasamento. Tudo isso demonstra as limitações dos testes realizados *in vitro* com relação a atividade hemorrágica e atividade sobre células endoteliais em específico.

Alguns estudos mostram que certas desintegrinas de venenos com a sequência RGD característica interagem com determinadas integrinas, o que gera um efeito sobre adesões focais, resultando no arredondamento e destacamento das células do seu substrato (YEH et al., 1998; HONG et al., 2003; WU et al., 2003). Já foi discutido acima que esse efeito não foi observado nas células endoteliais em cultura após exposição à Bar-III. Mas é também relatado que algumas desintegrinas ligam-se à determinadas integrinas expressas na superfície de diferentes tipos celulares, particularmente plaquetas, células endoteliais e algumas células tumorais, levando à inibição de agregação plaquetária ou adesão celular, migração e angiogênese (CALVETE, 2013; HUANG et al., 2001). Sendo assim, foram feitos testes para avaliar a capacidade de interferência da Bar-III no processo de adesão de células endoteliais em cultura à fibronectina. Os resultados demonstraram interferência significativa no processo de adesão das células a esse substrato, sendo essa interferência dependente da concentração de Bar-III. Como a incubação da toxina com as células endoteliais é feita em solução (células em suspensão), um teste de viabilidade nessas condições foi realizado previamente, resultando em uma diminuição da viabilidade somente na concentração de 100 µg/mL de Bar-III. Dessa maneira, os testes de adesão foram feitos com concentrações menores que esta. Além disso, foram feitos testes de imunomarcagem para avaliar a capacidade de ligação da Bar-III sobre células endoteliais, que demonstrou interação específica dessa toxina na superfície dessas células. Foi verificado também que parte dessa ligação da toxina na superfície das células é em receptores integrina $\alpha 5\beta 1$, sendo esse receptor conhecidamente descrito como receptor de fibronectina

(SCARBOROUGH et al, 1993). Esses resultados corroboram com a diminuição da adesão em fibronectina das células endoteliais incubadas com a Bar-III, e sugerem que parte dessa inibição de adesão pode ser explicada pela ocupação dos sítios das integrinas $\alpha 5\beta 1$ pela toxina. Esse bloqueio na ligação de células endoteliais a fibronectina, que ocorre usualmente via integrinas, pode ser um impeditivo para proliferação, migração e diferenciação, tornando assim as células inviáveis (VEGA e SCHWARZBAUER, 2016). Moléculas com essas características já demonstraram capacidade de aplicação biotecnológica gerando medicamentos com atividade de inibição de agregação plaquetária por bloquear sítio de integrinas dependentes de RGD (STANISZEWSKA et al, 2008; TIAN et al 2007, LUCENA et al, 2015, MINEA et al, 2012). Compostos com atividade dessa natureza podem também inibir por esse mecanismo a metástase tumoral (ZHOU et al, 2000), e angiogênese em tumores (MARCINKIEWICZ, 2007).

Pelos resultados apresentados nesse trabalho, a degradação de moléculas de matriz extracelular como fibronectina (interferência nos processos de hemostasia e estabilidade tecidual), vitronectina (também relacionada à processos de hemostasia) e colágeno IV (diminuição da estabilidade da membrana basal), e finalmente a interferência da Bar-III na adesão entre células endoteliais e fibronectina, que decorre, pelo menos em parte, pela competição entre Bar-III e fibronectina pelos sítios de determinadas integrinas, indicam a importância da Bar-III no processo de hemorragia observado no envenenamento por serpentes da espécie *Bothrops barnetti*. Além disso, esses resultados abrem uma perspectiva de estudo do potencial antiangiogênico e antitumoral dessa SVMP de *B. barnetti*.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, PLMM; JACINTO CN; SILVA-JUNIOR, GB; LIMA, JB; VERAS, MSB; DAHER EF; Acute kidney injury caused by crotaluz and Bothrops Snake Venom: Review of Epidemiology, Clinical Manifestations and Treatment, **Rev do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2013. 55 P295-301
- ALI SA, STOEVA S, ABASSI A, ALAM JM, KAYED R, VOELTER W, Isolation, Structural and functional characterization of na apoptosis induction LAO from leaf-nosed viper snake venom, **Archive of Biochemistry and Biophysics**, 2000 p 216-226
- ANGULO, Y, LOMONTE, B; SASA, M.; GUTIERREZ, J. M. The phospholipase A2 homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. **Prot. Pept. Lett**, v. 16, p. 860–876, 2009.
- ASCH, E; PODACK, E, Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation, **the journal of clinical investigation**, p1372-1378
- ASKORN, N; CHANVORACHOTE, P, Integrin as a molecular target for anti-cancer, Approaches in Lung Cancer, **Anticancer research**, p 541-548
- BALDO, C; FERREIRA, MJ; LOPES, DS; IZIDORO, LFM; GOMES, AO; FERRO, EAV; HAMAGUCHI, A HOMSI-BRANDEBURGO, MI; RODRIGUES, VM, Action of neuwiedase, a metalloproteinase isolated from Bothrops neuwiedi venom, on skeletal muscle: na ultrastructural anda immunocytochemistry study, **Jounal of venomous animals and toxins**, 2010
- BALDO C, LOPES, DS; FAQUIM-MAURO, EL; JACYSYN, JF; NILAND S; EBLE, JÁ; CLISSA, PB; MOURA-DA-SILVA, AM; Jararhagon disrupton of endotelial cell Anchorage is enhanced in collagen enriched matrices, **Toxicon**, 2015, 240-248
- BUSTAMANTE JL, FLORES V; Informe de la consulta técnica sobre accidentes com animales pozoñosos en latino américa, 2007 Peru
- BORKOW, G; LOMONTE, B; GUTIERREZ, JM; OVADIA, M; Effect of various viperidae and crotalidae snake venoms on endotelial cells in vitro, **Toxicon**, 1994, p.1689-1695
- BORKOW G; GUTIERREZ, JM; OVADIA, M; Inhibition of toxic activities of Bothrops asper venom and other crotalid snake veno by a novel neutralizing mixture, **Toxicology and applied pharmacology**, 1997 442-447
- CALVETE JJ, SANZ L, ANGULO Y, LOMONTE B, GUTIÉRREZ JM, Venom, Venomics and Antivenomics, **FEBS letters**, 2009 p 1736-1746
- CALVETE JJ, Continuing saga of snake venom disintegrins, **Toxicon**, 2013, p.40-49
- CALVETE, JJ; MARCINKIEWICZ, C; MONLEON, D; ESTEVE, V; CELDA, B; JUAREZ P, SANZ,L; Snake venom disintegrin: evolution of structure and function, **Toxicon**, 2005, p 1063-1074
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. **Comstock Publishing Associates**, Ithaca and London. 2004 1032p
- CARRILLO DE ESPINOZA N, Lista taxonomica preliminar de los repiteles vivente del Perú, **Publicaciones del museo de historia natural**, 1995 p 1-27
- CHOUDHURY, SN; BARLINA, K; SIMRAN K; DOLEY, R; MONDAL, B; Study on Snake venom protein antibody interaction by surface plasmon resonance spectroscopy, **Photonic Sensors**, 2018 193-202

CRUZ MD; VARGAS R; LOPES AA; Snake bite Envenomation and Death in the Developing World, **Ethnicity Disease**, p42-46 2009

DE LUCA, M; WARD, CM; OHMORI, K; ANDREWS, RK; BERNDT, MC; Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, alpha 2 beta 1, **Biochemical and biophysical research communications**, 1995, 570-576

DIAZ, C; VALVERDE, L; BRENES, O; RUCAVADO, A; CUTIERREZ, JM; Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells, **Journal of cellular biochemistry**, 2005, 520-528

DU, X.; CLEMENTSON, K.J. Thrombin-Like Snake Venom Serine Proteinases, In: MARCKESSY, S.P. (Ed.). Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. New York: **CRC Press**, 2010. cap. 6, pg. 139-154.

ESCALANTE, T; NUNEZ, J; MOURA-DA-SILVA, A; RUCAVADO, A; THEAKSTON, RDG; GUTIERREZ, JM; Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca snake venom, **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2003 p.17-28

ESCALANTE, T; RUCAVADO, A; PINTO, AF; TERRA, RM; GUTIERREZ, JM; FOX, JM; Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins, **Journal of proteome research**, 2009, p. 5120-5131

ESCALANTE, T; RUCAVADO, A; PINTO, AF; TERRA, AM; GUTIERREZ, JM; FOX JW; Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins, **Journal on proteome research**, 2011 p.5120-5131

ESTEVAO-COSTA, MI, GONTIJO SS, YARLEQUE, A, CHAVES-OLORTEGUI, C, SANCHEZ EF, Neutralization of toxicological activities of medically-relevant bothrops snake venoms and relevant toxin by two polyvalent bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil, **Toxicon**, 2016, p 1-11

FOX, JW; MA L, NELSON K, NICHOLAS; SHERMAN E, SERRANO SMT; Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes, **Toxicon**, 700-714, 2004

FOX JW, SERRANO SMT, Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity, **FEBS Journal**, 2008 3016-3030

GAWAZ, M; NEUMANN, FJ; DICKFIELD, T; REININGER, A; ADELSBERDER, H; GEBHARDT, A; SHOMIG, A, Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction, **Circulation**, 2007 p.1809-1018

GOULD, DB, PHALAN, FC; BREEDVELD GJ, VAN MIL, SE; SMITH, RS; SCHIMENTI, JC; AGUGLIA, U; VAN DER KNAAP, MS; HEUTINK, P; JOHN, SW; Mutation in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly, **Science**, 2005, p.1167-1171

GRAMS, R; HUBER, R; KRESS, LF, MORODER, L; BODE, W, Activation of snake venom metalloproteinase by a cysteine switch-like mechanism, **Federation of European Biochemical Societies FEBS letters**, 1993 p73-80

GUTIERREZ, JM; RUCAVADO, A Snake Venom metalloproteinase, their role in the pathogenesis of local tissue damage, **Biochimie**, 2000 p 841-850

GUTIERREZ, JM; NUNEZ, J; ESCALANTE, T; RUCAVADO, A; Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase, **Microvascular research**, 2006, p.55-63

GUTIERREZ, JM, 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**, p19-29

GUTIERREZ JM, ESCALANTE, T; RUCAVADO, A; HERRERA, C; FOX, JW; A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): Novel perspectives on the pathophysiology of envenoming, **Toxins**, 2016,

HERRERA, C; ESCALANTE, T; VOISIN, MB; RUCAVA, A; MORAZAN, D; MACEDO, JK; CALVETE, JJ; SANZ, L; GUTIERREZ, JM; FOX, JW; Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII, PIII, snake venom metalloproteinases: clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage, **Plos neglected tropical diseases**, 2015

HERRERA, C; VOISIN, MB; ESCALANTE, T; RUCAVADO, A; NOURSHARGH,S; GUTIERREZ, JM; Effects of PI and PIII Snake venom hemorrhagic metalloproteinases on the microvasculature: A confocal microscopy study on the mouse cremaster muscle, **Plos One**, 2016

HONG, SY; LEE, H; YOU, WK; CHUNG, KH; KIM, DS; SONG, K; The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells, **Biochemical and biophysical research communications**, 2003 p.502-508

HOWES JM, THEAKSTON RD, LAING GD, Neutralization of the haemorrhagic activities of viperine snake venoms and venom metalloproteinases using peptide inhibitors and chelators, **Toxicon**, 2007 734-739

JIA, LG; WANG, XM; SHANNON, JD. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A, inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists, **Journal of Biological Chemistry**,p94-102

KAMIGUTI, AS; HAY, CR; Inhibition of Collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha_2\beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin, **Biochemical Journal**, 1996 p 635-641

KANG TS, GEORGIEVA D, GENOV N, MURAKAMI MT, SINHA M, KUMAR RP, KAUR P, KUMAR S, DEY S, SHARMA S, VRIELINK A, BETZEL C, TAKEDA S, ARNI RK, SINGH TP, KINI RM. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, 2011 p. 4544-4576

KHOSHNOODI, J; PEDCHENKO, V; HUDSON, BG; Mammalian collagen IV, **Microscopy research and technique**, 2008, p 357-370

KIRISTI, D; HAS, C; BUCKNER-TUDERMAN, L; Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa, **Cell adhesion & migration**, 2013 p. 135-141

KOHLHOF M, BORGES MH, YARLEQUE A, CABESZAS C, RICHARDSON M, SANCHEZ EF, Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops Atrox*, *B. Barnetti*, and *B. Pictus*, **Journal of proteomics**, 2012 p2181-2195

KONDO H, KONDO,S; IKEZAWA, H; MURATA, R; OSHAKA, A; Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom, **Jap Journal of Medical Sciences**, 1960, 43-51

LAURENS, N; ENGELSE, MA; JUNGERIUS, C; LOWIK, CW; VICTOR, WM; HINSBERG, V; KOOLWIJK, P, Single and combined effect of $\alpha_V\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins on capillary tube formation in a human fibrinous matrix, **Angiogenesis**, 2009, p.275-285

LIMAM, I; BRAZAA, A; SRAIRI-ABID, N; TABOUBI, S; JEBALI, J; ZOUARI-KESSENTINI R; MARRAKCHI, N, Leberagin-C, A disintegrin-like/cystein-rich protein from *Macrovipera lebetina*

- transmediterranea venom, inhibits $\alpha 5 \beta 1$ integrin-mediated cell adhesion, **Matrix Biology**, 2010 p.117-126
- MATSUI T., FUJIMURA Y., TITANI K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis, 2000. **Biochimic. Biophysica Acta**, 1477: 146 – 156
- MACKESSY SP, BAXTER LM. Bioweapons synthesis and storage: the venom gland of front-fanged snakes. **Zool Anz.** 2006; 245: 147-159
- MARCINKIEWICZ, C, Pharmacological impact of snake venom compounds, **Current pharmaceutical design**, 2007 p. 2851-2852
- MARKLAND, FS; SWENSON, S; Snake venom metalloproteinases, **Toxicon**, 2013 p 3-18
- MAROUN RC. Molecular basis for the partition of the essential functions of thrombin among snake venom serine proteinases. The case of thrombin-like enzymes. **Haemostasis** 2001: 247–256
- MARTIN, GR; TIMPL, R; Laminin and other basement membrane components, **Annual Review of cell biology**, 1987 57-85
- MAZZI, VM; MARCUSSI, S; STABELI, RG; FRANCO, JJ; FRANÇA, SC; SOARES, A; SAMPAIO, SV; A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacuçu* snake venom: Isolation and Biochemical characterization, **Toxicon**, 2004 215-223
- MIERKE, CT; FREY, B; FELLNER, M; HERRMAN, M; FACRY, B; Integrin $\alpha 5 \beta 1$ facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces, **Journal of cell science**, 2010 p.369-383
- MINISTERIO DE SALUD DE PERU, Norma Técnica Sobre Prevención Y Tratamiento de Accidentes por Animales Porofofosos (2013)
- MONTECUCCO C, GUTIÉRREZ JM, LOMONTE B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell and molecular lifesciences**, 2008 p2897-2912
- MOURA-DA-SILVA, AM; RAMOS, OHP; BALDO, C; NILAND, S; HANSEN, U; VENTURA, JS; FURNAL, S; BUTERA, D; DELLA-CASA, MS; TANJONI, I; CLISSA, PB; FERNANDES, I; CHUDZINSKI-TAVASSI, AM; EBLE, JÁ; Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases, **Biochimie**, 2008, 484-492
- MOSESSON, MW; Fibrinogen and fibrin structure and functions, **Journal of thrombosis and haemostasis**, 2005 p 1894-1904
- MOURA-DA-SILVA, AM; MARCINKIEWICZ, C; MARCINKIEWICZ, M; NIEWAROWSKI, S, Selective recognition on $\alpha 2 \beta 1$ integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom, **Thrombosis Research**, 2001, 153-159
- NGUYEN, H; HUYNH, K; STOLDT, VR; Shear-dependent fibrillogenesis of fibronectin: Impact of platelet integrins and actin cytoskeleton, **Biochemical and biophysical research communications**, 2018 p.797-803
- OBRIG, TG; LOUISE, CB; MORAN, TP; MORI, N; TU, AT; Direct cytotoxic effects of hemorrhagic toxins from *Crotalus ruber ruber* and *Crotalus atrox* on human vascular endothelial cells, in vitro, **Micruvasculature research**, p.412-416
- PICKFORD, AR; CAMPBELL, ID; NMR studies of modular protein structures and their interactions, **Chemical reviews**, 3557-3566
- PLOW, EF; HAAS, TA; ZHANG, L; LOFTUS, J; SMITH, JW, Ligand Binding to Integrin, **The Journal of biological chemistry**, p.21785-21788

RAMOS, OH, KAUSKOT A; A novel alpha(v)beta(3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-o1, inhibits Bfgf-induced angiogenesis and melanoma metastasis, **Clin Exp Metastasis**, 2008 p.53-64

RODRIGUES RS, DA SILVA JF, BOLDRINI-FRANÇA J, FONSECA FP, OTAVIANO AR, HENRIQUE-SILVA F, HAMAGUCHI A, MAGRO AJ, BRAZ AS, DOS SANTOS JI, HOMSI-BRANDEBURGO MI, FONTES MR, FULY AL, SOARES AM, RODRIGUES VM. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie** 2009 91: 490-501.

ROJAS E, AL ET, Neutralization of four peruvian *Bothrops* sp Snake Venoms, by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica, Preclinical Assessment, **Acta Tropica**, 2005 p,85-95

ROODT, AR, LITWIN S; ANGEL, SO; Hydrolisis by 17 snake venoms, **Comparativ biochemistry and physiology. Toxicology and pharmacology**, 2003, 469-479

RUCAVADO A, LOMONTE, B; OVADIA, M; GUTIERREZ, JM; Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated form *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Experimental and molecular pathology**, 1995, p. 186-199

RUCAVADO,A; ESCALANTE, T; FRANCESCHI, A Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent, **Journal of Tropical Medicine**, 2000, 313-319

RUCAVADO,A; ESCALANTE, T; SHANNON, J; GUTIERREZ, JM; FOX, JW; Proteomics of wound exudate in snake venom-induced pathology: search for biomarkers to asses tissue damage anf therapeutic success, **Journal os proteome research**, 2011, 1987-2005

RUIZ DEV, SANDOVAL GA, MENDOZA J, INGA RR, GONTIJO S, RICHARDSON, EBLE JÁ, YARLEQUE A, SANCHEZ EF, Coagulant Thrombin-like enzyme (barnettobin) form *Bothrops barnetti* venom, molecular sequence, analysis of its cDNA and biochemical properties, **Biochimie**, 2013 p. 1476-1486

SANCHEZ EF; SOUZA C; BELO, CA; RICHARDSON, M; OLIVEIRA, EB; MAGALHÃES, A; Resolution od isoforms of mutalysin III, the metalloproteinase from bushmaster snake venom, **Toxicon**, 2003, 1061-1070

SANCHEZ, EF, A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnttlysin-I from *Bothrops barnetti* Snake venom with Anti-platelet properties, **Biochemic and Biophisics Acta**, 2016 p 542-556

SAJEVIC T, LEONARDI A , KRIZAJ I; Haemostatically active proteins in snake venoms, **Toxicon**, 2011,p.627-645

SAKURAI, Y, SHIMA M, MATSUMOTO T, TAKATSUKA T, NISHIYA K, KASUDA S, YOSHIOKA A, Anticoagulant activity os M-LAO, L-aminoacid oxidase prified from agkistrodon halys blomhoffi, through selective inhibition of facto IX, **Biochimica and biophysica protein and proteomics**, 2003 p 51-57

SCARBOROUGH, RM; ROSE, JW; NAUGHTON, MA; PHILIPS, DR; NANNIZZI, L; ARFSTEN, A; CAMPBELL, AM; CHARO, IF; Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms, **Journal of biological chemistry**, 1993, p.1058-1065

SCHATTNER, M; FRITZEN, M; VENTRURA, JS; MODESTO, JCA; POZNER, RG; MOURA-DASILVA, AM; CHUDZINSKI-TAVASSE, AM; The snake venom metalloproteases berythraactivase anda jararhagin activate endotelial cells, **Biological Chemistry**, 2005, p.369-374

SERRANO SM, MAROUN RC; Snake Venom serine proteinase: sequence homolody vs substrate specificity, a paradox to be solved, **Toxicon**, p.1115-1132

- SERRANO SM, The long road of research on snake venom serine proteinase, **Toxicon**, 2013 p 19-26
- SOARES AM., GIGLIO JR. Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, 2003, 42, 855-68.
- SUHR SM, KIM DS, Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide, **Journal of biochemistry**, 1999 p 305-309
- SUNTRAVAT, M; BARRET, HS; JURICA, CA; LUCENA, SE, PEREZ, JC; SANCHEZ, EF; Recombinant disintegrin from crotalus adamanteus inhibits adhesion of human pancreatic cancer cell lines to laminin-1 and vitronectin, **Journal of venom research**, 2015, p.1-10
- STÁBELI, RODRIGO GUERINO; MARCUSSI, SILVANA; CARLOS, GUILHERME B. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from Bothrops alternatus snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 12, p. 2881-2886, 2004.
- STANISZEWSKA, I; SARIYER, IK; LECHT, S; BROWN, MC; WALSH, EM; TUSZYNSKI, GP; SAFAK, M; LAZAROVICI, P; MARCINKIEWICZ, C; Integrin alpha9beta1 is a receptor for nerve growth factor and other neurotrophins, **Journal of cell science**, 2008, p. 504-513
- STOCKER, W; BODE, W; Structural features of a superfamily of zincendopeptidases: the metzincins. **Current Opinion Structural Biology**, 1995 p 383-390
- SWENSON S, MARKLAND FS, Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes, **Toxicon**, 2005, 1021-1039
- TAKADA, Y; YE, X; SIMON, S; The integrins, **Genome Biology**, p.215-228
- TERRA, RMS; PINTO, AFM; GUIMARAES, JA; FOX, JW, Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMs) Insights into venom induced pathology, **Toxicon**, 2009 836-844
- TIAN, J; PAQUETTE-STRAUB,C; SAGE, EH; FUNK, SE; PATEL, V; GALILEO, D; MCLANE, MA; Inhibition of melanoma cell motility by the snake venom disintegrin eritostatin, **Toxicon**, 2007, 899-908
- VAN DER FLIER, A; BADU-NKANSAH, K; CHITTAKER, CA; CROWLEY, D; BRONSON, RT; LACY-HULBERT, A; HYNES, RO; Endothelial $\alpha 5$ and αv integrins cooperate in remodeling of the vasculature during development, **Development**, 2439-2449.
- VEGA, ME; SCHWARZBAUER, JE; Collaboration of fibronectin matrix with other extracellular signals in morphogenesis and differentiation, **Current opinion in cell biology**, 2016, p.1-6
- WARREL D; Snake Bite, **Lancet**, London, 2010 p77-78
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO guidelines. Curitiba, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming> Acesso em: 27 out. 2018.
- WU, WB; PENG, HC; HUANG, TF; Disintegrin causes proteolysis of beta-catenin and apoptosis of endothelial cells, Involvement of cell-cell and cell-ECM interactions in regulating cell viability, **Experimental cell research**, 2003, p.115-127
- WU, WB; HUANG, TF; Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis, **Experimental cell research**, 2003, 143-157
- ZAVALETA, A., SALAS, M., 1996. Ofidismo: envenenamiento por mordedura de serpientes. In: Martinez-Villaverde, J.R., Leon-Barua, R., Vidal-Neira, L., Losno-Garcia, R. (Eds.), **Emergencias en Medicina Interna**. Lima, Peru, pp. 241– 260.
- ZHANG PF, CHEN P, HU WJ, LIANG SP, Huwetoxin-V a novel insecticidal peptide toxin from *Selenocosmia huwena*, and a natural mutant of the toxin: indicates the key amino acid residues related to biological activity, **Toxicon**, 2003 p,15-20

ZHOU Q, HU P, RITTER MR, SWENSON SD, ARGOUNOVA S, EPSTEIN AL, MARKLAND FS, Molecular cloning and functional expression of cortrostatin, a homodimeric disintegrin from southern copperhead snake venom, **Arch Biochemic and biophysics**, 2000 p.278-288

ZHOU Q, SHERWIN, RP; PARRISCH, C; RICHTERS, V; GROSHEN, SG, TSAO-WEI, D; MARKLAND, FS; Contortrostatin, a dimeric disintegrin from Agkistrodon contortrix contortrix, inhibits breast cancer progression, **Breast Cancer research and treatmet**, 2000, p.249-260

YE, CH; PENG, HC; HUANG, TF; Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo, by acting as integrin alphavbeta3 antagonist and inducing apoptosis, **Blood**, 1998 p.3268-3276

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

11/12/2019

SEI/UFPR - 2235086 - CEUA/BIO: Certificado



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1308

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.064786/2019-33

APROVADO/APPROVAL: 17/09/2019 – R.O. 08/2019

TÍTULO: Caracterização funcional e bioquímica da Bar-III, uma metaloproteinase do veneno de *Bothrops barnetti*.

TITLE: Functional and biochemical characterization of Bar-III, a metalloproteinase from *Bothrops barnetti* venom.

AUTORES/AUTHORS: Luiza Helena Gremski, Pedro Henrique de Caires Schlaga, Bruno César Antunes, Hanna Câmara da Justa, Nayanne Louise Costacurta polli, Kamila Moreno.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Biologia Celular

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 21/10/2019, às 21:53, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **2235086** e o código CRC **B0092D0**.

