

Ministério da Saúde

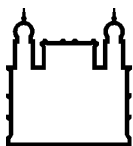
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DA PORÇÃO GLICÍDICA DE BJ46a, UM INIBIDOR DE
METALOPROTEINASES DE VENENOS DE SERPENTES**

VIVIANE DE ALMEIDA BASTOS

RIO DE JANEIRO
Agosto de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

VIVIANE DE ALMEIDA BASTOS

Caracterização da porção glicídica de BJ46a, um inibidor de metaloproteinases de venenos de serpentes

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Richard Hemmi Valente

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2014

B327 Bastos, Viviane de Almeida

Caracterização da porção glicídica de BJ46a, um inibidor de metaloproteinases de venenos de serpentes / Viviane de Almeida Bastos. - Rio de Janeiro, 2014.

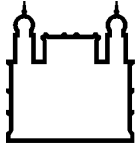
xvi. 99f.: il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 85-97.

1. Imunidade natural. 2. Inibidor de metaloproteinases 3. Bothrops jararaca. 4. Glicosilação. I. Título.

CDD 615.942



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

VIVIANE DE ALMEIDA BASTOS

CARACTERIZAÇÃO DA PORÇÃO GLICÍDICA DE BJ46a, UM INIBIDOR DE METALOPROTEINASES DE VENENOS DE SERPENTES

ORIENTADOR: Dr. Richard Hemmi Valente

Aprovada em: 12 / 08 / 2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Dario Eluan Kalume – IOC / FIOCRUZ - **Presidente**

Prof. Dr. Fábio César Sousa Nogueira – UFRJ

Prof. Dr. André Lopes Fuly – UFF

Prof. Dr. André Teixeira da Silva Ferreira – IOC / FIOCRUZ

Profa. Dra. Denise Maria Guimarães Freire - UFRJ

Rio de Janeiro, 12 de Agosto de 2014.

Ao meu avô, Octavio Lopes de Almeida, com muito amor.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o amor, carinho e compreensão. Vocês são a base do meu viver... Obrigada por sempre acreditar em mim e dar a força necessária para correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Dr. Richard Hemmi Valente, a minha mais profunda gratidão por cada um dos ensinamentos - não só científicos - dados a mim durante estes quatro anos de convivência. Por ser extremamente atencioso e dedicado em todos os momentos, e por incentivar a dar sempre o melhor de mim.

À Dra. Ana Gisele Neves Ferreira, obrigada por todo o carinho e apoio dados na parte final do meu Mestrado, que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Jonas Perales, por ter me recebido na equipe do Laboratório de Toxinologia, além de ser um líder exemplar e preocupado não só em dar a melhor infra-estrutura e os melhores recursos para trabalharmos, mas também com o bem-estar de toda a equipe.

À Surza Lucia Rocha, muito obrigada pela amizade e companheirismo durante estes anos, além de sempre ter a mão estendida para ajudar quando precisei.

À Luciana Girão, obrigada pela amizade, pelo carinho e pelas risadas! Seu jeito de ser alegrava todos os meus dias no Laboratório e sua companhia fazia a jornada de trabalho ser sempre agradável, mesmo que puxada.

À Renata Cardoso, minha grande amiga, obrigada por todas as risadas, conversas, e as sempre maravilhosas saídas e viagens, e por sempre estar do meu lado, em todos os momentos.

À Tatiane Cozendey e Xênia Souto, obrigada por todos os bons momentos durante o curso do Mestrado;

A toda equipe do Laboratório de Toxinologia, obrigada pela convivência sempre harmoniosa de todos os dias. Nunca teve um dia no laboratório em que fui embora sem dar uma boa risada!

Finalmente, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado dentro do Edital Toxinologia (063/2010).

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização da porção glicídica de BJ46a, um inibidor de metaloproteinases de venenos de serpentes

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Viviane de Almeida Bastos

O envenenamento por serpentes é uma condição de saúde negligenciada que registra altas taxas anuais de mortalidade e morbidade. A administração do soro antiofídico, quando apropriada, é eficaz na neutralização dos efeitos sistêmicos do envenenamento, mas novas abordagens terapêuticas são necessárias para a redução dos índices de morbidade. A resistência natural da serpente *Bothrops jararaca* ao seu próprio veneno é atribuída parcialmente à presença de uma glicoproteína sérica, BJ46a, que atua como um inibidor natural de metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMP). O objetivo principal do trabalho foi caracterizar a porção glicídica de BJ46a e sua relevância para a atividade biológica do inibidor. As análises demonstraram que a porção glicídica de BJ46a é composta primariamente por N-glicosilações complexas e sialiladas, ancoradas nas posições Asn76, Asn185, Asn263 and Asn274. Após incubação prolongada (72h) de BJ46a com exoglicosidases e PNGase F, foi possível remover substancialmente a parte glicídica do inibidor. BJ46a extensivamente desglicosilada foi capaz de interagir com a metaloproteinase jararagina (SVMP de classe P-III) e inibir efetivamente sua atividade proteolítica sobre azocaseína. Além disso, também analisamos a interação de BJ46a com diferentes metaloproteinases isoladas de venenos de serpentes. O inibidor foi capaz de interagir com as SVMP (classe P-I) BaP1, atroxlisina-I e leucurolisina-a, inibindo sua atividade fibrinogenolítica. O entendimento estrutural da inibição de metaloproteinases por BJ46a pode levar ao desenho racional de peptídeos inibitórios que venham a ser utilizados tanto na terapia antiofídica quanto em outras patologias.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Characterization of the glycan moiety of BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELL BIOLOGY

Viviane de Almeida Bastos

Snake bite envenoming is a neglected health condition that inflicts high rates of mortality and morbidity every year. The antivenom treatment, when properly administered, is effective in neutralizing the systemic effects but new approaches are needed to address the issue of morbidity. The resistance of the venomous snake *Bothrops jararaca* against its own venom is partly attributed to a serum glycoprotein, BJ46a, that acts as a natural snake venom metalloproteinase inhibitor. Our main goal was to characterize the glycan moiety of BJ46a and its relevance to its biological activity. The analyses have shown that the glycan portion of BJ46a is composed primarily by sialylated, complex-type N-glycans attached in the positions Asn76, Asn185, Asn263 and Asn274. Substantial glycan removal from BJ46a in native conditions was attained by prolonged incubation (72h) with exoglycosidases and PNGase F. Extensively deglycosylated BJ46a was able to interact with the class PIII metalloproteinase jararhagin and effectively inhibit its proteolytic activity upon azocasein. Also, we analyzed the interaction of BJ46a with different metalloproteinases isolated from snake venoms. The inhibitor was able to interact with the class P-I metalloproteinases BaP1, atroxlysin-I and leucurolysin-a inhibiting their fibrinogenolytic activities. The understanding of the structural requirements for the metalloproteinase inhibition by BJ46a could lead to the rational design of synthetic peptides that could be used in antiophidic therapy as well in other pathologies.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Epidemiologia dos acidentes ofídicos	1
1.2 - Metaloproteinases de venenos de serpentes	3
1.3 - Terapia Antiofídica e Inibidores Naturais de Venenos de Serpentes	7
1.4 - Glicosilação de Proteínas.....	10
2 - OBJETIVOS	14
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 - Material	15
3.2 - Métodos	15
3.2.1 - Purificação do inibidor BJ46a a partir do plasma de <i>Bothrops jararaca</i>	15
3.2.2 - Quantificação de proteínas	16
3.2.3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida	16
3.2.4 - Revelação de géis por Coomassie R-250.....	17
3.2.5 - Revelação de géis por Coomassie G-250.....	17
3.2.6 - Revelação de géis por impregnação por prata	18
3.2.7 - Revelação de glicoproteínas em géis de poliacrilamida pela técnica de ácido periódico / reagente de Schiff	18
3.2.8 - Aquisição e análise de imagens de géis de poliacrilamida	19
3.2.9 - Digestão trípica em gel de poliacrilamida para análise por espectrometria de massas.....	19
3.2.10 - Análises de peptídeos por espectrometria de massas	20
3.2.11 - Análises de proteínas íntegras por espectrometria de massas	21
3.2.12 - Ensaio de interação entre BJ46a e SVMP por SDS-PAGE / PAGE Nativo .	21
3.2.13 - Ensaio de inibição da atividade azocaseínolítica de Jararagina por BJ46a.	22
3.2.14 - Ensaio de inibição da atividade fibrinogenolítica de metaloproteinases de venenos de serpentes por BJ46a.....	22
3.2.15 - Ensaio de interação entre BJ46a e jararagina por cromatografia de exclusão molecular.....	23
3.2.16 - Desglicosilação de BJ46a em condições desnaturantes e redutoras pela glicoamidase PNGase F.....	23

3.2.17- Ensaio de desglicosilação enzimática de BJ46a pela endoglicosidase H	25
3.2.18 - Desglicosilação sequencial de BJ46a em condições nativas por exoglicosidasas	25
3.2.19 - Desglicosilação de BJ46a em condições nativas	26
3.2.20 - Investigação dos sítios de N-glicosilação em BJ46a	26
3.2.21 - Análises computacionais pelo software PEAKS 6	27
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 - Purificação do inibidor de metaloproteinasas BJ46a	28
4.2 - Análise da interação de BJ46a com diferentes metaloproteinasas de venenos de serpentes	33
4.3 – Caracterização estrutural da N-glicosilação de BJ46a.....	43
4.3.1- Identificação dos sítios de N-glicosilação de BJ46a por Espectrometria de Massas.....	43
4.3.2 - Análise do tipo de N-glicosilação de BJ46a utilizando a enzima Endoglicosidase H.....	59
4.3.3 – Análise da composição / estrutura das antenas oligossacarídicas de BJ46a através de hidrólises sucessivas com exoglicosidasas monitorada por Espectrometria de Massas.....	61
4.4 – Otimização das condições de desglicosilação extensiva de BJ46a utilizando a glicoamidase PNGase F.....	67
4.4.1 - Sob condições desnaturantes e redutoras.....	67
4.4.2 - Sob condições nativas	72
4.5 - Análise da relevância da porção glicídica de BJ46a para sua atividade inibitória.....	77
5 - CONCLUSÕES.....	83
6 - PERSPECTIVAS	84
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8- ANEXOS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Incidência mundial dos acidentes ofídicos.	2
Figura 2: Composição do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	3
Figura 3: Representação esquemática das classes de metaloproteinases presentes em venenos de serpentes.	5
Figura 4: Tipos de N-glicosilação encontrados em glicoproteínas.	12
Figura 5: Cromatografia de interação hidrofóbica do plasma de <i>Bothrops jararaca</i> sem precipitação prévia por sulfato de amônio.	29
Figura 6: SDS-PAGE dos <i>pools</i> de frações cromatográficas oriundas da cromatografia de interação hidrofóbica do plasma de <i>B. jararaca</i> sem precipitação prévia por sulfato de amônio.	30
Figura 7: Perfis cromatográficos resultantes da separação dos <i>pools</i> #1, #2, #3, #4 #5 e #6 (figura 6) por cromatografia de fase reversa em coluna C4 (10 x 250mm).	31
Figura 8: SDS-PAGE das frações cromatográficas coletadas durante a separação cromatográfica dos <i>pools</i> por cromatografia de fase reversa.	32
Figura 9: SDS-PAGE e PAGE Nativo dos complexos entre BJ46a e as toxinas BaP1, leucurolisina-a e atroxlisina-I.	35
Figura 10: Ensaio de inibição da atividade fibrinogenolítica das SVMP atroxlisina-I, BaP1 e leucurolisina-a por BJ46a.	38
Figura 11: Perfis cromatográficos obtidos para Jararagina, BJ46a e diferentes proporções de inibidor: toxina por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200.	41
Figura 12: SDS-PAGE em condições não-redutoras das frações coletadas do experimento de interação entre BJ46a e jararagina por cromatografia de exclusão molecular.	42
Figura 13: Determinação da massa molecular de jararagina, BJ46a e o complexo entre estas duas proteínas na proporção de 1:1 por Superdex 200.	42
Figura 14: Ensaio de inibição da atividade azocaseínolítica de jararagina por BJ46a. As porcentagens de inibição foram calculadas relativas ao controle de atividade (jararagina 5µg).	43
Figura 15: Fluxograma experimental para a determinação dos sítios N-glicosilados de BJ46a.	45

Figura 16: Cobertura de sequência para BJ46a digerida com tripsina e endoproteinase Asp-N.....	51
Figura 17: Cobertura de sequência para BJ46a digerida com tripsina, desglicosilada por PNGase F e digerida com endoproteinase Asp-N.	52
Figura 18: Representação esquemática do substrato mínimo para a ação da Endoglicosidase H.....	59
Figura 19: Ensaio de desglicosilação por endoglicosidase H das proteínas ovalbumina, BSA e BJ46a.....	61
Figura 20: Análise por MALDI/TOF de BJ46a nativa e parcialmente desglicosilada com neuraminidase.....	62
Figura 21: Análise por MALDI/TOF de BJ46a tratada com neuraminidase e parcialmente desglicosilada com neuraminidase e β -galactosidase.....	65
Figura 22: Análise por MALDI/TOF de BJ46a parcialmente desglicosilada com neuraminidase + β -galactosidase e com β -N-acetilglicosaminidase.....	66
Figura 23: Desglicosilação de α -1 glicoproteína ácida humana e BJ46a na presença de RapiGest SF a 0,25% (p/v).	68
Figura 24: Otimização das condições de desglicosilação de BJ46a em condições desnaturantes e redutoras utilizando o surfactante RapiGest. Nas concentrações de 0,25% e 0,063 (p/v).	69
Figura 25: Condições otimizadas de desglicosilação de BJ46a com PNGase F.	71
Figura 26: Espectros em modo linear de BJ46a desglicosilada com exoglicosidases e PNGase F.....	73
Figura 27: Análise por SDS-PAGE de BJ46a nativa e após desglicosilação com exoglicosidases e PNGase F em condições nativas.....	76
Figura 28: Ensaio de formação de complexos entre BJ46a nativa, BJ46a desglicosilada por exoglicosidases e PNGase F com a SVMP jararagina.	78
Figura 29: Ensaio de inibição de atividade azocaseinolítica da SVMP jararagina por BJ46a nativa e BJ46a extensivamente desglicosilada por exoglicosidases e PNGase F.....	81

LISTA DE TABELAS E ANEXOS

Tabela 1: Rendimento da purificação de BJ46a sem precipitação prévia do plasma de <i>B. jararaca</i> por sulfato de amônio	32
Tabela 2: Identificação do conteúdo protéico das bandas excisadas dos géis exibidos na figura 9 por Orbitrap.	36
Tabela 3: Análise dos sítios de N-glicosilação de α -1 glicoproteína ácida humana por meio da quantificação de desamidações em asparagina por <i>spectral counting</i> e predição dos sítios pela ferramenta Net-N-Glyc 1.0 server (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc).....	47
Tabela 4: Análise dos sítios de N-glicosilação de albumina de soro bovino (BSA) por meio da quantificação de deamidações em asparagina por <i>spectral counting</i> e predição dos sítios pela ferramenta Net-N-Glyc 1.0 server (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc).....	48
Tabela 5: Análise dos sítios de N-glicosilação de BJ46a por meio da quantificação de desamidações em asparagina por <i>spectral counting</i> e predição dos sítios pela ferramenta Net-N-Glyc 1.0 Server (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc).	53
Tabela 6: Peptídeos com desamidação em asparagina identificados na amostra de BJ46a tratada com tripsina e Asp-N.....	54
Tabela 7: Peptídeos com desamidação em asparagina identificados na amostra de BJ46a tratada com tripsina, PNGase F e Asp-N.....	56
Tabela 8: Volumes normalizados das bandas de BJ46a nativa (raia 3) e desglicosilada com exoglicosidases (raia 4) exibidas no painel B da figura 25. .	77
Tabela 9: Identificação do conteúdo protéico das bandas excisadas do gel exibido na figura 28 por nanoLC-nanospray-LTQ-Orbitrap.	80

ANEXOS:

Figura 30: Desglicosilação de α -1 glicoproteína ácida, BSA e BJ46a em condições desnaturantes e redutoras (SDS / DTT).	98
Figura 31: Desglicosilação de α -1 glicoproteína ácida, BSA e BJ46a em condições desnaturantes (Uréia 8M) após redução e alquilação das cisteínas com DTT / iodoacetamida.	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACS — *American Chemical Society* (Sociedade Americana de Química)
- ADAM — *A disintegrin and metalloproteinase* (Metaloproteinase com domínio disintegrina)
- BSA – *Bovine serum albumin* (soroalbumina bovina)
- cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar
- CID – *Collision-induced dissociation* (dissociação induzida por colisão)
- Da – Dalton
- DTT - Ditioneitol
- EDTA-Na₂.2H₂O – Sal dissódico de ácido etilendiaminotetracético diidratado
- ESI – *Electrospray ionization* (ionização por eletrospray)
- FWHM - *Full width at half maximum*
- HPLC - *High-performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta performance)
- LC – *Liquid chromatography* (cromatografia líquida)
- MALDI – *Matrix-assisted laser desorption ionization* (dessorção a laser assistida por matriz)
- MMP – *Matrix metalloproteinases* (metaloproteinases de matriz)
- MS – *Mass Spectrometry / Spectrometer*
- m/z – Razão massa / carga
- NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para Informações Biotecnológicas)
- OST - *Oligosaccharyl transferase* (complexo enzimático da oligossacariltransferase)
- PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)
- PLA₂ – *Phospholipase A₂* (fosfolipase A₂)
- pH - Potencial hidrogeniônico = - log[H⁺]
- PLI - *Phospholipase A₂ inhibitor* (inibidor de fosfolipase A₂)
- SDS – *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
- Sequon – Sequência consenso
- SVMPI - *Snake venom metalloproteinase inhibitor* (inibidor de metaloproteinase de veneno de serpente)
- SVMP– *Snake venom metalloproteinase* (metaloproteinase de veneno de serpente)

TFA - Trifluoroacetic acid (ácido trifluoroacético)

TFMS - Trifluoromethanesulfonic acid (ácido trifluorometanosulfônico)

TOF - *Time-of-flight* (analisador de massas do tipo tempo de voo)

Tris - 2-Amino-2-(hidroximetil)-propano-1,3-diol

vWF - *Von Willebrand Factor* (fator de von Willebrand)

Nomenclatura adotada para monossacarídeos e sua massa média correspondente:

Monossacarídeo	Abreviação	Massa média (Da)
Galactose	Gal	162,10
Manose	Man	162,10
Fucose	Fuc	146,10
Ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico)	NeuNAc	291,26
N-acetilglicosamina	GlcNAc	203,20

Notações de única letra e massa monoisotópica de cada resíduo de aminoácido, empregados nesta dissertação:

Resíduo	Notação	Massa monoisotópica (Da)
Alanina	A	71,03
Arginina	R	156,10
Asparagina	N	114,04
Ácido aspártico	D	115,02
Ácido glutâmico	E	129,04
Cisteína	C	103,0
Fenilalanina	F	147,06
Glutamina	Q	128,05
Glicina	G	57,02
Histidina	H	137,05
Isoleucina	I	113,08
Leucina	L	113,08
Lisina	K	128,09
Metionina	M	131,04
Prolina	P	97,05
Serina	S	87,03
Treonina	T	101,4
Triptofano	W	186,07
Tirosina	Y	163,06
Valina	V	99,06

1 – INTRODUÇÃO

1.1- Epidemiologia dos acidentes ofídicos

Os envenenamentos por serpentes constituem um grave problema de saúde pública em vários países da Ásia, África, Oceania e Américas do Sul e Central. Esta patologia afeta principalmente a parcela mais pobre da população localizada nas áreas rurais destas regiões, onde o acesso aos sistemas de saúde é limitado e a infraestrutura dos centros médicos é, por vezes, deficiente (Harrison *et al.* 2009).

A incidência real dos acidentes ofídicos no mundo não é conhecida; as estimativas disponíveis atualmente baseiam-se em registros hospitalares, frequentemente incompletos e não sistematizados em muitos países, o que dificulta o levantamento dos dados. Além disso, uma parte significativa das vítimas de acidentes ofídicos dispensa o atendimento médico, dando preferência a tratamentos tradicionais e assim contribuindo para a subestimação dos índices de mortalidade e morbidade (Rahman *et al.* 2010).

Ainda assim, as estatísticas mais conservadoras apontam para uma incidência de cinco milhões de acidentes ofídicos por ano, levando a 25.000-125.000 mortes e 400.000 pessoas com sequelas permanentes (Gutierrez *et al.* 2013). No Brasil, estima-se que ocorram entre 26.000 e 29.000 casos de mordedura de serpentes por ano (de Oliveira *et al.* 2009). Frequentemente associado a condições de subdesenvolvimento, o envenenamento por serpentes tem recebido atenção insuficiente das autoridades de saúde, e as altas taxas de mortalidade e morbidade associadas levaram a Organização Mundial de Saúde a classificar o envenenamento por serpentes como uma condição de saúde negligenciada em 2009 (Williams *et al.* 2010).

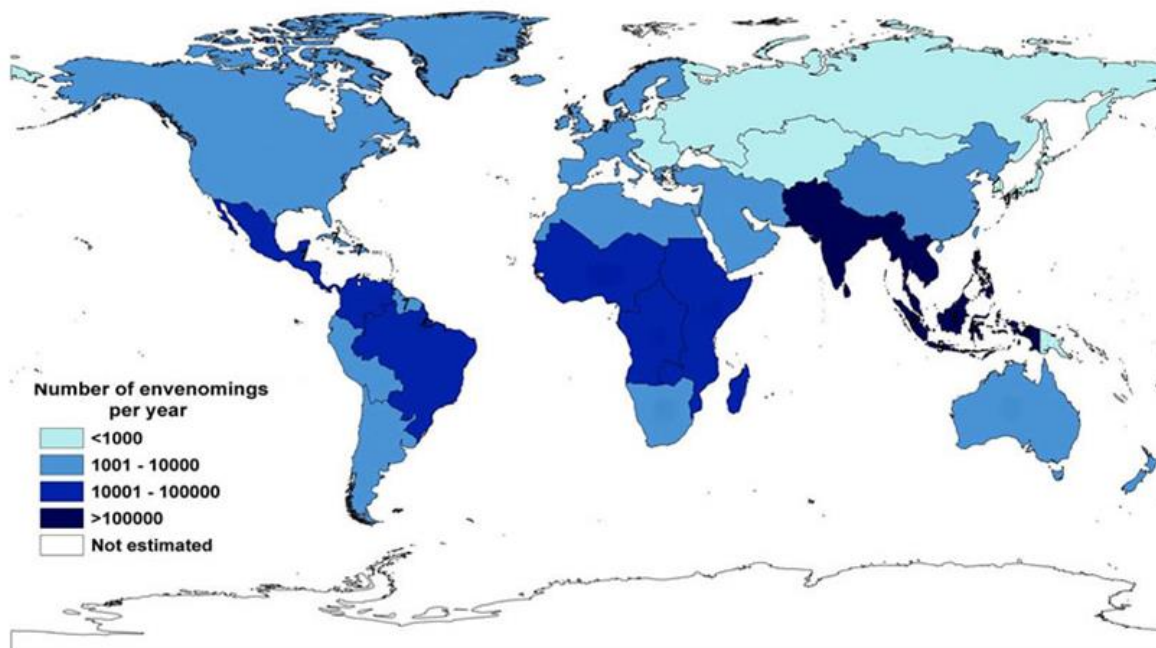


Figura 1: Incidência mundial dos acidentes ofídicos.

Reproduzido de Kasturiatne *et al.* (2008)

Estima-se que haja no mundo 3000 espécies de serpentes, das quais 410 são consideradas venenosas; as serpentes pertencentes às famílias *Viperidae* e *Elapidae* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos em todo o mundo (Cruz e Lopes 2009; Warrell 2010). As cascavéis (gênero *Crotalus*) são responsáveis pela maior parte dos acidentes ofídicos na América do Norte, enquanto que serpentes do gênero *Bothrops* estão mais envolvidas em casos de ofidismo nas Américas do Sul e Central (Gutierrez 2011).

No Brasil, a serpente *Bothrops jararaca* responde pela maioria dos casos de ofidismo do país, de acordo com os dados do Ministério da Saúde (2012). Os acidentes botrópicos apresentam uma sintomatologia muito característica: edema, equimose, bolhas, necroses e mionecroses são manifestações locais do envenenamento, enquanto que coagulopatias, hemorragias, hipotensão e falência renal aguda são sintomas sistêmicos do acidente (Wen e Malaque 2013). Estas manifestações clínicas são o resultado de uma ação sinérgica de várias proteínas tóxicas e não-tóxicas, com ou sem ação enzimática, nos capilares sanguíneos, músculos esqueléticos, terminais nervosos e em componentes do sistema

hemostático. O veneno de serpentes viperídeas é particularmente rico em metaloproteínas, serinoproteínas, fosfolipases A₂ e lectinas do tipo C / C-símile, sendo que, no veneno de *B. jararaca*, as metaloproteínas são o componente mais abundante (Nicolau 2012).

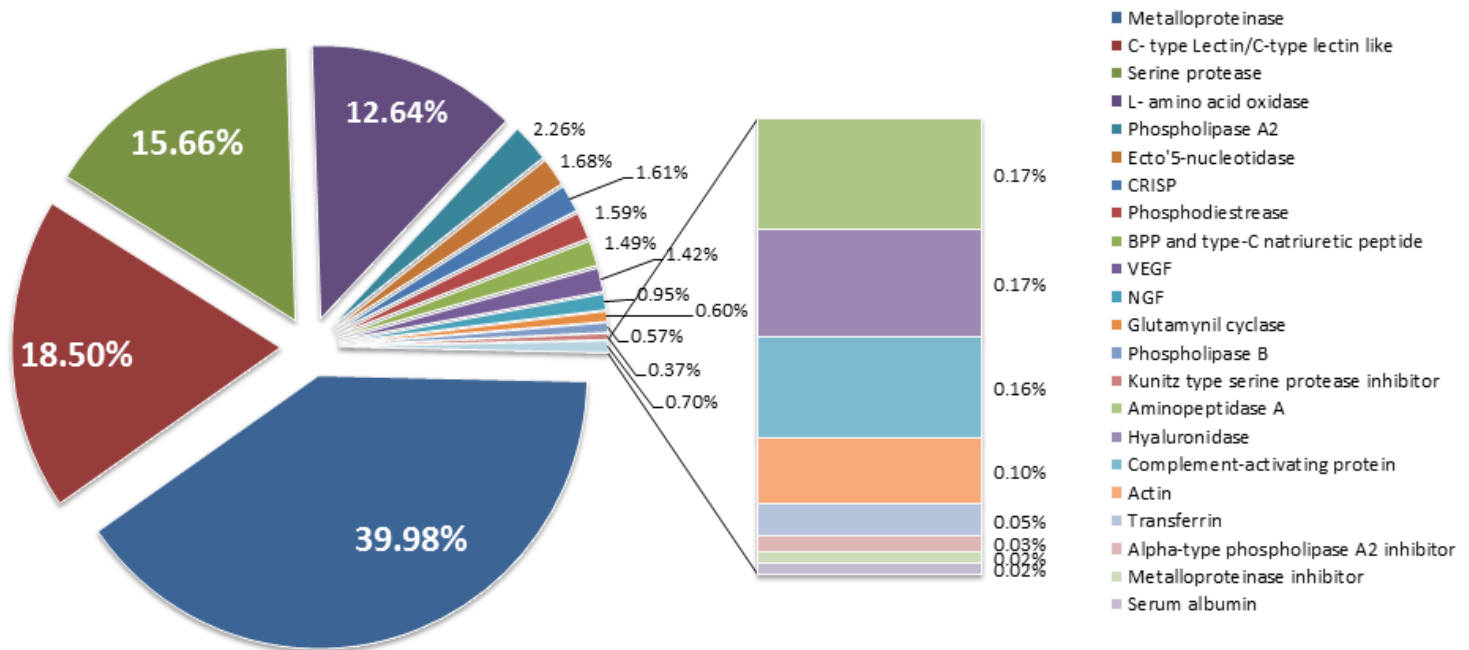


Figura 2: Composição do veneno de *Bothrops jararaca*.

Reproduzido de Nicolau (2012).

1.2 – Metaloproteínas de venenos de serpentes

As metaloproteínas de venenos de serpentes (SVMP – *snake venom metalloproteinases*) são toxinas especialmente envolvidas na progressão da síndrome hemorrágica característica dos acidentes botrópicos. Devido a este efeito, as SVMP também podem ser chamadas de hemorraginas (Kamiguti *et al.* 1996). As SVMP pertencem à família M12 das metaloproteínas, grupo que também engloba as ADAM / ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase / a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), proteínas envolvidas nos processos

de sinalização, reconhecimento celular e interação com a matriz extracelular (Edwards *et al.* 2008; Porter *et al.* 2005).

As SVMP são sintetizadas na forma de zimógenos (pré-pro-proteinase). A região “pré” consiste em uma sequência de endereçamento para o retículo endoplasmático; a região do pró-domínio é composta de 200 resíduos e apresenta a sequência PKMCGVT, responsável pela inibição do domínio catalítico em um mecanismo conhecido como *cysteine-switch*. Neste mecanismo, o grupamento tiol da cadeia lateral de cisteína liga-se ao íon Zn^{2+} presente no sítio catalítico, impedindo a atividade proteolítica da toxina (Hite *et al.* 1994; Ramos *et al.* 2003).

Após a síntese da toxina no retículo endoplasmático, as SVMP são endereçadas para o Golgi, para a maturação de eventuais N-glicosilações e então secretadas na forma de zimógenos pelas células endoteliais da glândula. Uma vez no lúmen da glândula de veneno, as SVMP sofrem processamento proteolítico, gerando a forma madura e biologicamente ativa da proteína (Moura-Da-Silva *et al.* 2009; Portes-Junior *et al.* 2014). Estas formas maduras são então classificadas em diferentes classes – PI, PII, PIII – de acordo com os diferentes domínios estruturais apresentados por estas proteínas (Fox e Serrano 2005).

A classe PI é composta de metaloproteinases que apresentam apenas o domínio metaloproteinase em sua estrutura. Este domínio contém o motivo HEXXHXXGXXHD, encontrado em todas as SVMP. As SVMP de classe PII apresentam, além do domínio metaloproteinase, um domínio desintegrina em sua estrutura. Este domínio contribui para a inibição da agregação plaquetária mediada por colágeno e adesão celular mediada por integrinas *in vitro* (Gutierrez *et al.* 2010).

Na recente classificação das SVMP proposta por Fox e Serrano em 2008, a classe PII foi subdividida nas classes PIIa a PIIe (**Figura 3**). As SVMP PIIa sofrem processamento no lúmen da glândula de veneno, liberando um domínio desintegrina e uma SVMP de classe PI; as PIIb não sofrem este processamento, mantendo os domínios metaloproteinase e desintegrina unidos, enquanto que a subclasse PIIc representam a forma dimérica das SVMP de classe PIIb. Por fim, as subclasses PII d e PII e consistem de uma forma precursora que dá origem a desintegrinas diméricas e heterodiméricas, respectivamente (Fox e Serrano 2008).

A classe PIII das SVMP, além de apresentarem o domínio desintegrina característico das SVMP de classe PII, também possuem um domínio rico em cisteína em sua estrutura. Este domínio, assim como o domínio desintegrina, contribui para a inibição da agregação plaquetária *in vitro*, além de interagir com o

fator de von Willebrand, e proteínas de matriz extracelular, como o colágeno XIV e XII e matrinas (Gutierrez *et al.* 2010). A classe PIII foi subdividida nas classes PIIIa a PIII d (**Figura 3**). A subclasse PIIIa corresponde as SVMP com os domínios metaloproteinase, desintegrina e rico em cisteína unidos; a subclasse PIIIb é representada pelas SVMP PIIIa que sofrem processamento, liberando o domínio metaloproteinase e os domínios desintegrina e rico em cisteína; a subclasse PIIIc consiste nas SVMP de classe PIIIa que sofrem oligomerização, gerando sua forma dimérica. Por fim, a subclasse PIII d das SVMP, anteriormente classificada como uma classe independente (classe PIV), engloba toxinas que apresentam domínios de lectina tipo C ligados à estrutura da classe PIII por pontes dissulfeto (Fox e Serrano 2005; 2008).

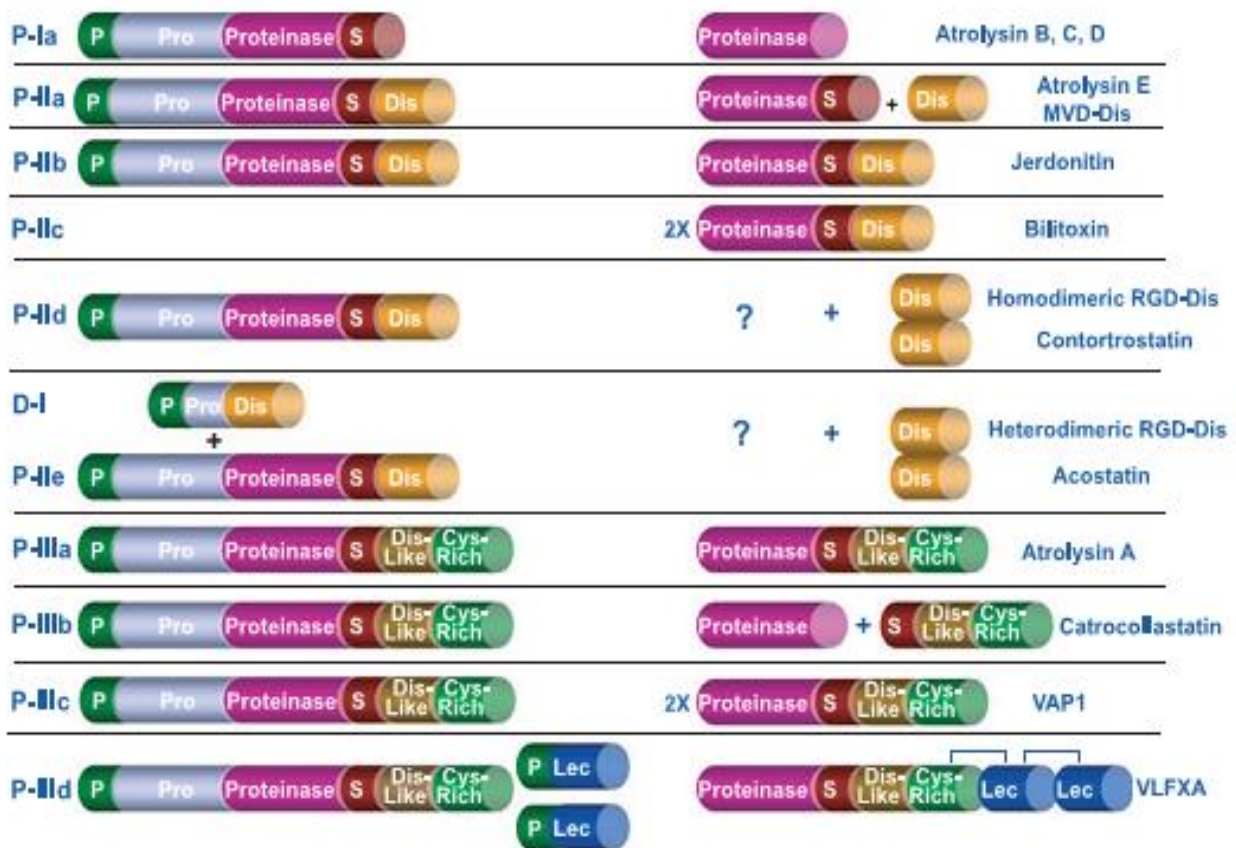


Figura 3: Representação esquemática das classes de metaloproteinases presentes em venenos de serpentes.
Reproduzido de Fox e Serrano (2008).

A síndrome hemorrágica promovida pelas metaloproteinases de venenos de serpentes é extremamente complexa, envolvendo diversos alvos moleculares e que se inicia logo após a inoculação do veneno. Estudos ultraestruturais indicam que a degradação dos componentes da membrana basal do endotélio vascular é um dos eventos iniciais da hemorragia, levando ao extravasamento de eritrócitos e apoptose de células endoteliais (Moreira *et al.* 1994; Tanjoni *et al.* 2005). Este extravasamento de sangue promove isquemia dos músculos no local do acidente, causando mionecrose, um efeito local característico de venenos de serpentes viperídeas (Gutierrez e Rucavado 2000).

Paralelamente à ruptura dos capilares, as SVMP também contribuem com alterações no sistema hemostático, interagindo com vários elementos da cascata de coagulação, promovendo fibrinólise, fibrinogenólise e ativando fatores de coagulação (FX e FII) (Sajevic *et al.* 2011). Tais alterações são frequentemente utilizadas na prática clínica para avaliar a severidade do envenenamento e a eficiência da soroterapia (White 2005). As plaquetas, componentes fundamentais da hemostasia, também são afetadas pelas SVMP, que inibem sua agregação mediada por colágeno e por integrinas de superfície, além de hidrolisarem o fator de von Willebrand, glicoproteína auxiliar na agregação plaquetária, tornando o sangue da vítima incoagulável (Kamiguti 2005).

Além de induzir dano aos músculos locais e promover a síndrome hemorrágica, as SVMP também induzem a ativação de células inflamatórias, liberando mediadores inflamatórios e atraindo ainda mais células para o local do acidente. Jararagina, uma SVMP de classe PIII isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, possui ainda a capacidade de processar a molécula precursora do fator de necrose tumoral α (TNF- α), citocina relacionada com a indução de edema e necrose no membro atingido (Clissa *et al.* 2001; Escalante *et al.* 2011).

1.3– Terapia Antiofídica e Inibidores Naturais de Venenos de Serpentes

A terapia antiofídica atual, proposta originalmente por Calmette, Phisalix e Bertrand em 1894, baseia-se na administração parenteral do soro antiofídico, produzido a partir da imunização de animais de grande porte com doses subletais de venenos de serpentes (Calmette 1894; Espino-Solis *et al.* 2009). Os antissoros podem ser monoespecíficos (capazes de neutralizar as toxinas presentes em um veneno de um único gênero de serpente) ou poliespecíficos, produzidos a partir de misturas imunizantes mais complexas, que neutralizam os efeitos deletérios de venenos oriundos de diferentes gêneros (Silva *et al.* 2013; Theakston 1997).

Quando administrado de maneira adequada, o soro antiofídico é capaz de neutralizar efetivamente os efeitos sistêmicos do envenenamento, como a síndrome hemorrágica e a falência renal aguda, no caso de acidentes botrópicos. Os danos locais, como a mionecrose e o edema, são parcialmente neutralizados. A má neutralização dos efeitos locais pela soroterapia resulta de um conjunto de fatores, como a progressão extremamente rápida do dano tecidual, que danifica a microvasculatura do local atingido e compromete o acesso das imunoglobulinas ao local e a baixa resposta imune equina contra toxinas de baixa massa molecular presentes nos venenos de serpentes, como as fosfolipases A₂ e algumas metaloproteinases (Battellino *et al.* 2003; Gutierrez *et al.* 2007; Queiroz *et al.* 2008). A dificuldade em se combater os danos locais causados pelos envenenamentos pode gerar desde sequelas leves até a amputação do membro atingido, contribuindo para os altos índices de morbidade associados aos acidentes ofídicos (Gutierrez *et al.* 2007).

Outro problema grave associado à terapia antiofídica é a ocorrência de reações anafiláticas, devido à exposição do sistema imunológico às imunoglobulinas de cavalos e/ou seus fragmentos, que podem ocorrer de maneira imediata ou tardia (5 a 24 dias após a exposição). A reação anafilática tardia é caracterizada pela formação de imunocomplexos – “doença do soro”, que pode agravar ainda mais o quadro clínico do paciente (Gutierrez 2012). Além disso, há sérios problemas com relação à segurança dos antissoros (presença de pirógenos) e a logística de distribuição aos locais mais remotos, uma vez que os soros demandam condições específicas para a sua preservação (Morais e Massaldi 2009).

Muitas estratégias vem sendo propostas para aumentar a eficácia dos soros antiofídicos – uso de anticorpos monoclonais, novos métodos de purificação das

imunoglobulinas, análises venômicas e antivenômicas para otimizar o conteúdo do *pool* de venenos utilizado para imunizar os animais e, ainda, o uso de inibidores que possam ser aplicados *in situ* para minimizar os danos locais causados pelos envenenamentos. Nesse contexto, o estudo dos inibidores naturais de venenos de serpentes torna-se de especial interesse para o desenvolvimento de terapias complementares à administração do soro antiofídico (Girish e Kemparaju 2011; Harrison *et al.* 2011).

Atualmente, estão descritos 42 inibidores naturais de venenos de serpentes isolados do sangue e dos tecidos de mamíferos e serpentes que apresentam uma notável resistência aos efeitos deletérios do veneno. Estas proteínas agem como aceptores solúveis, prontos para neutralizar a ação das toxinas contidas no veneno, por meio da formação de um complexo estável e mantido por forças de natureza não-covalente. Estes inibidores foram divididos em duas grandes classes: os inibidores de metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMPI – *snake venom metalloproteinase inhibitor*) e os inibidores de fosfolipase A₂ (PLI – *phospholipase A₂ inhibitor*) (Neves-Ferreira *et al.* 2010).

Os inibidores naturais de metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMPI) são glicoproteínas ácidas, majoritariamente diméricas e mantêm sua atividade inibitória em uma ampla faixa de pH e temperatura. Os SVMPI isolados do plasma e tecido de mamíferos foram classificados como membros da superfamília gênica das imunoglobulinas ou da família da ficolina / opsonina P35. Por outro lado, os inibidores isolados do plasma de serpentes foram classificados como membros da superfamília das cistatinas (Neves-Ferreira *et al.* 2010).

Do tecido muscular do porco-espinho *Erinaceus europaeus* foi isolada a erinacina, o único SVMPI pertencente à família da ficolina / opsonina P35. Este SVMPI apresenta uma estrutura multimérica complexa formada a partir das subunidades α , de 38kDa, e β , de 35kDa. Juntas, estas subunidades formam um arranjo do tipo $\alpha_{10} \cdot 2\beta_{10}$, e este agrupamento de 1.070 kDa constitui a erinacina. O inibidor foi capaz de interagir com jararagina, uma SVMP de *Bothrops jararaca*, em uma proporção estequiométrica de 1:1; os autores especulam que a presença de domínios colágeno-símile e fibrinogênio-símile presentes na erinacina podem ser os responsáveis pelo processo de inibição de SVMP por esta molécula (Omori-Satoh *et al.* 2000).

Os SVMPI da superfamília gênica das imunoglobulinas foram isolados de marsupiais da família *Didelphidae* e do mangusto *Herpestes edwardsii*, mamíferos

conhecidos por predarem serpentes venenosas (Voss e Jansa 2012). DM43, isolado do plasma do gambá *Didelphis aurita*, vem sendo amplamente estudado e foi o primeiro SVMPI desta família a ser completamente sequenciado. DM43 é uma glicoproteína ácida de 291 resíduos e apresenta três domínios tipo imunoglobulina e quatro sítios de N-glicosilação do tipo complexo. Em condições nativas, DM43 é uma proteína homodimérica, com subunidades de 43kDa cada uma. Análises por modelagem molecular indicaram que o monômero de DM43 apresenta três domínios proteicos (D0, D1, D2) e, no momento da interação com SVMP, o dímero se dissocia e cada monômero interage com uma molécula de toxina (León *et al.* 2012; Neves-Ferreira *et al.* 2000; Neves-Ferreira *et al.* 2002).

Além de inibir a atividade hemorrágica das metaloproteinasas, DM43 também foi capaz de inibir a atividade fibrinogenolítica e caseinolítica do veneno de *Bothrops jararaca*, além de inibir a hidrólise de fibrinonectina. Entretanto, DM43 não foi capaz de interagir com jararagina-C, indicando que a interação DM43-toxina ocorre no domínio metaloproteinase da toxina (Neves-Ferreira *et al.* 2000; Neves-Ferreira *et al.* 2010).

O primeiro SVMPI isolado da superfamília das cistatinas foi o inibidor HSF (*habu serum factor*), do plasma da serpente *Trimeresurus (Protobothrops) flavoviridis*. A análise de sua estrutura primária revelou que HSF é uma proteína de 322 resíduos, com três sítios putativos de N-glicosilação, bem como dois domínios cistatina e um domínio rico em histidina (*His-rich domain*) na região C-terminal. Análises por espectrometria de massas (MALDI-TOF) revelaram que HSF possui uma massa de 47.810 Da. O inibidor foi capaz de inibir as metaloproteinasas HR1 e HR2 do veneno de *T. flavoviridis* e também metaloproteinasas hemorrágicas e não-hemorrágicas do veneno de *Gloydius halys brevicaudus*, sugerindo um amplo perfil de inibição de SVMP (Deshimaru *et al.* 2005; Deshimaru *et al.* 2003; Yamakawa e Omori-Satoh 1992).

Outros inibidores da família das cistatinas incluem cMSF e jMSF, isolados do plasma das serpentes *Gloydius blomhoffii brevicaudus* e *Gloydius blomhoffii* e apresentam 83,5% de identidade de sequência quando comparados com HSF. Entretanto, estas proteínas apresentam uma deleção de 17 resíduos em sua extremidade C-terminal, e são menos termoestáveis do que HSF (Valente *et al.* 2009).

Do plasma da serpente *Bothrops jararaca*, foi isolado o inibidor BJ46a, alvo do presente trabalho. Assim como HSF, BJ46a apresenta dois domínios cistatina e

um domínio rico em histidina em sua porção C-terminal. Por MALDI-TOF, BJ46a apresentou uma massa de 46.101 Da, enquanto que, por cromatografia de exclusão molecular, a massa do inibidor foi calculada em 79 kDa, sugerindo uma natureza dimérica. Os experimentos de interação de BJ46a com atrolisina-C (SVMP de classe PI) e jararagina (SVMP de classe PIII) indicaram que, no momento da interação, ocorre a dissociação do dímero de BJ46a e que cada subunidade é capaz de interagir com duas moléculas de toxina, provavelmente pelos dois motivos cistatina presentes na estrutura do inibidor (Valente *et al.* 2001).

Recentemente, Ji e colaboradores demonstraram que BJ46a também é capaz de inibir a invasão, colonização e metástase de células cancerígenas, provavelmente por meio da inibição da atividade proteolítica das metaloproteinases de matriz 2 e 9 (Ji *et al.* 2013). Logo, BJ46a se apresenta não só como uma proteína promissora para o desenvolvimento de terapias complementares à administração do soro antiofídico, mas também para a terapia do câncer e de demais patologias associadas com a expressão desregulada de metaloproteinases.

1.4- Glicosilação de Proteínas

De todos os 42 inibidores naturais de venenos de serpentes descritos até então, 32 deles foram descritos como glicosilados (Neves-Ferreira *et al.* 2010). A glicosilação de proteínas é considerada como uma das modificações pós-traducionais mais complexas encontradas em proteínas. As cadeias glicídicas afetam o enovelamento, estabilidade e atividade biológica, além de terem um papel relevante em processos biológicos fundamentais, como a adesão celular, transdução de sinais e endocitose (Spiro 2002).

Os carboidratos podem ser ancorados à cadeia polipeptídica por ligações glicosídicas em cadeias laterais de serina e treonina (O-glicosilação), ligações carbono-carbono em resíduos de triptofano (C-glicosilação), por âncoras de glicofosfatidilinositol (GPI), no extremo C-terminal de proteínas de membrana e, ainda, por uma ligação amida (GlcNAc- β 1-Asn) em cadeias laterais de asparagina (N-glicosilação) (Freeze e Haltiwanger 2009; Moremen *et al.* 2012). Análises bioinformáticas revelaram que pelo menos 50% das sequências proteicas depositadas no banco de dados SWISS-PROT apresentam sequências consenso

para a N-glicosilação, indicando que este tipo de inserção de glicídeos é o mais frequente em glicoproteínas (Apweiler *et al.* 1999).

A N-glicosilação de proteínas ocorre no lúmen do retículo endoplasmático, simultaneamente à síntese da cadeia polipeptídica pelos ribossomos aderidos à membrana da organela. O complexo enzimático da oligossacariltransferase (OST) catalisa a transferência de um glicídeo precursor, composto de três resíduos de glicose, nove de manose e dois de N-acetilglicosamina ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) para a sequência consenso de N-glicosilação (NXS / NXT / NXC, onde X equivale a qualquer resíduo com exceção de prolina). É importante ressaltar que, apesar da presença da sequência consenso ser uma condição necessária para ocorrência de N-glicosilação, a adição dos glicídeos pela OST pode ser restringida pela conformação da cadeia polipeptídica nascente e até mesmo pela natureza do aminoácido que ocupa a posição X – resíduos ácidos, como aspartato / glutamato reduzem a eficiência da reação e a sequência consenso pode não ser glicosilada, criando a chamada macroheterogeneidade, isto é, a ocupação variável das sequências consenso de N-glicosilação apresentadas por uma dada glicoproteína (Stanley *et al.* 2009).

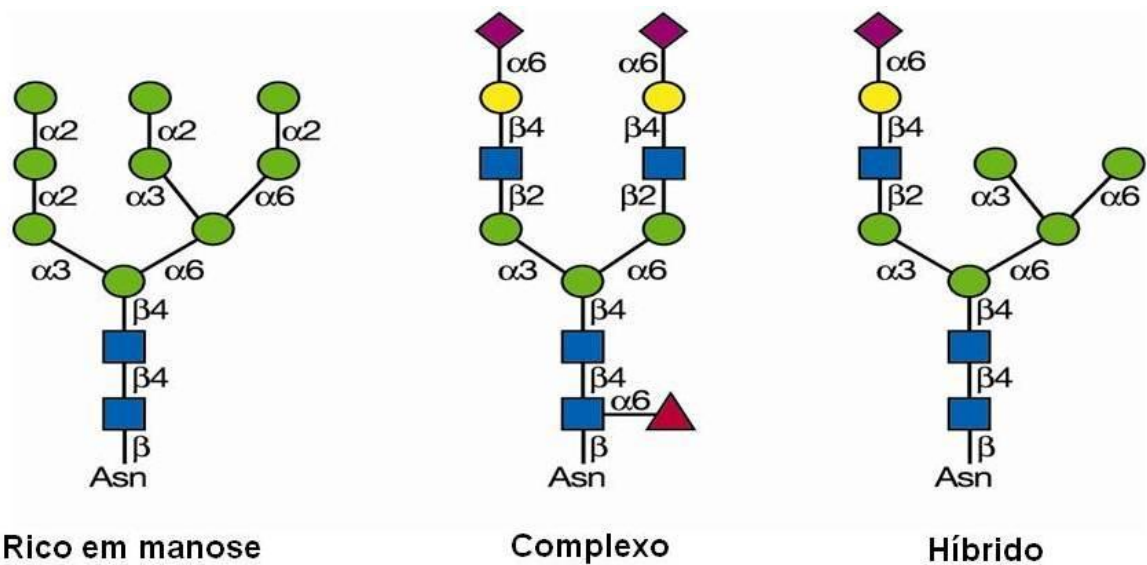
Após a transferência do glicídeo precursor pela OST, ocorre a remoção das glicoses terminais por α -glicosidases, o que promove a ligação da cadeia polipeptídica às chaperonas calnexina e calreticulina, iniciando o enovelamento proteico (Molinari 2007). Uma vez corretamente enovelada, manosidases removem resíduos de manose terminais da proteína, o que é interpretado como um sinal para o início da exportação da proteína para o Golgi (Kamiya *et al.* 2012).

Nesta organela, diferentes glicosidases e glicosiltransferases atuam sequencialmente para sintetizar a forma madura da parte glicídica. De acordo com os glicídeos presentes nas ramificações, os N-glicanos podem ser classificados em três categorias estruturais: glicosilações do tipo rico em manose, híbrido ou complexo. Em todas as três categorias, os N-glicanos compartilham um núcleo comum, formado por dois resíduos de N-acetilglicosamina e três de manose ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$). Eventualmente, ocorre a adição de fucose ligada na posição $\alpha 1 \rightarrow 6$ à segunda molécula de GlcNAc (Stanley *et al.* 2009).

Em N-glicosilações do tipo rica em manose, as ramificações da cadeia glicídica apresentam apenas resíduos de manose; no tipo complexo, o oligossacarídeo precursor sofre desbaste de glicosidases para ocorrer a adição de novos resíduos como N-acetilglicosamina, galactose e ácido siálico; por fim, as N-glicosilações do

tipo híbrido apresentam antenas compatíveis com ambos tipos de cadeias oligossacarídicas descritas anteriormente (**Figura 4**) (Aebi *et al.* 2009; Stanley *et al.* 2009).

É interessante notar que as glicosiltransferases e glicosidasases residentes no Golgi competem entre si por aceptores e por cofatores, e sua expressão varia em função do tipo celular, do estágio de desenvolvimento e do microambiente celular. Assim, a natureza dos açúcares e a quantidade de ramificações presentes na parte glicídica de uma proteína são variáveis, podendo cada sítio de N-glicosilação apresentar diferentes estruturas glicídicas associadas, o que é chamado de microheterogeneidade glicídica (Mariño *et al.* 2010).



Legenda:

● - Manose ● - Galactose ■ - N-acetilglicosamina ▲ - Fucose ◆ - Ácido siálico

Figura 4: Tipos de N-glicosilação encontrados em glicoproteínas.
Adaptado de (Stanley *et al.* 2009).

A macro- e a microheterogeneidade na glicosilação de proteínas resulta em uma série de glicofomas para uma única proteína, cada uma podendo ter sua própria função biológica (Schwarz e Aebi 2011; Skropeta 2009). Além disso, os diferentes glicídeos ancorados em uma glicoproteína podem influenciar significativamente a atividade biológica. Como exemplo, vários componentes da cascata de coagulação sanguínea são proteínas glicosiladas, e para o fator tecidual, a desglicosilação promove uma queda em sua atividade procoagulante; efeito semelhante foi visto para o fator X, onde a remoção dos resíduos de ácido siálico desta glicoproteína reduziu expressivamente sua ativação tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca de coagulação (Preston *et al.* 2013).

Por outro lado, há relatos na literatura associando a N-glicosilação com um aumento na atividade enzimática – darbopoiatina, um análogo hiperglicosilado da eritropoiatina, apresenta uma maior meia-vida plasmática e atividade enzimática superior a da eritropoiatina recombinante *in vivo*. Para alguns receptores de membrana, a perda da glicosilação reduz a afinidade do receptor ao seu ligante (Skropeta 2009).

BJ46a, inibidor alvo deste trabalho, apresenta quatro sítios putativos de N-glicosilação em sua estrutura, sendo dois confirmados indiretamente pela Química de Edman. Os glicanos representam cerca de 17% da massa do monômero do inibidor (Valente *et al.* 2001) e, apesar de ter um percentual de glicosilação relevante, ainda não há nenhum estudo na literatura caracterizando sua parte glicídica. Tendo em vista o potencial biotecnológico de BJ46a, o estudo detalhado de sua porção glicídica é indispensável para entendermos o mecanismo de ação do inibidor e para traçarmos futuras abordagens terapêuticas com base nesta molécula.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Estudar a parte glicídica de BJ46a, um inibidor natural de metaloproteinases de venenos de serpentes, assim como analisar sua interação com diferentes metaloproteinases de venenos de serpentes.

2.2 – Objetivos Específicos

1. Implementar uma metodologia otimizada para a purificação do inibidor BJ46a;
2. Analisar a interação entre BJ46a e diferentes metaloproteinases de venenos de serpentes;
3. Identificar experimentalmente os sítios de N-glicosilação presentes em BJ46a por espectrometria de massas;
4. Estabelecer as condições experimentais para a remoção enzimática das N-glicosilações presentes em BJ46a em condições desnaturantes e em condições nativas;
5. Caracterizar estruturalmente a porção glicídica de BJ46a através de deglicosilação com endo- e exoglicosidases;
6. Analisar a relevância da porção glicídica de BJ46a para a atividade biológica desta proteína.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Material

O plasma de *Bothrops jararaca* foi gentilmente cedido pela Dra. Norma Yamanouye do Instituto Butantan (SP). Amostras de leucurolisina-a e atroxlisina-I foram gentilmente cedidas pelo Dr. Eládio Sanchez, Fundação Ezequiel Dias, Minas Gerais. Amostras de BaP1 foram cedidas pela Dra. Tereza Escalante, Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica. Jararagina foi isolada do veneno de *B. jararaca* como descrito por (Paine *et al.* 1992). Todos os reagentes foram de grau ACS, ou melhor. Toda a água utilizada foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore) e todos os tampões foram filtrados em membranas de 0,45 µm.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Purificação do inibidor BJ46a a partir do plasma de *Bothrops jararaca*

O plasma de *B. jararaca* (10 mL) foi inicialmente filtrado em membranas de 0,45µm para remover qualquer material em suspensão. Em seguida, 10 mL de uma solução contendo fosfato de sódio a 0,2 M e sulfato de amônio a 2 M pH 7,0 foram adicionados lentamente ao plasma filtrado, seguido de centrifugação a 10.000 xg por 15 min à 4°C. O sobrenadante foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose CL-4B (16 x 250mm) previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M + sulfato de amônio 1 M pH 7,0. A separação foi realizada por meio de um gradiente linear decrescente de 1 a 0 M de sulfato de amônio durante cinco volumes de coluna a uma taxa de fluxo de 0,5mL/min, sendo a absorvância monitorada em 215 e 280nm, em sistema cromatográfico Äkta Purifier (Amersham Biosciences). As frações enriquecidas em BJ46a originadas da cromatografia de interação hidrofóbica foram precipitadas com sulfato de amônio a 80% de saturação e submetidas diretamente à cromatografia líquida de alta performance em coluna de fase reversa C4 (10 x 250mm - Grace Vydac) a 2,5 mL/min à temperatura ambiente, sendo a absorvância monitorada a 215nm em sistema cromatográfico LC-10AS (Shimadzu). O sistema de solventes utilizado foi composto de TFA a 0,1% (v/v) em água MilliQ (solvente A) e TFA a 0,08% (v/v) em acetonitrila (solvente B). As condições isocráticas iniciais foram de 5% de solvente

B por 5 min, seguido do seguinte gradiente: 25% de B em 5min; até 42% em 10min; até 47% em 25min; até 60% em 5 min e até 80% B em 10 min. As frações coletadas foram imediatamente liofilizadas.

3.2.2 - Quantificação de proteínas

O conteúdo proteico de todas as amostras foi determinado por 2D-QuantKit (GE Healthcare) e /ou por Qubit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se BSA como proteína padrão.

3.2.3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

Todas as análises por eletroforese foram conduzidas de acordo com o método descrito por Laemmli (Laemmli 1970), em sistemas Mini-Protean III (Bio-Rad Laboratories) ou VertILO (Loccus Biotecnologia). O gel de empilhamento foi preparado com acrilamida a 4% T / 2,67% C em tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8 com SDS a 0,4% (m/v), enquanto que o gel de corrida foi preparado com acrilamida a 12% T / 2,67% C em tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8 com SDS a 0,4% (m/v). Às amostras a serem analisadas, adicionamos tampão de amostra duas ou cinco vezes concentrado, de maneira que a composição final do tampão fosse Tris-HCl 0,06M pH 6,8, SDS 2% (m/v), DTT 20mM, glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol a 0,025% (m/v). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 min, resfriadas até a temperatura ambiente e centrifugadas a 14.000xg por 5 min para aplicação no gel. Os parâmetros elétricos da corrida foram de 200V constantes por aproximadamente 40 min, em tampão de corrida contendo Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,8. Os padrões de calibração utilizados (GE Healthcare) foram: fosforilase B (97kDa), BSA (66kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor trípico de soja (20,1kDa) e α -lactoalbumina (14,4kDa). Para a análise em condições nativas, os géis de poliacrilamida foram confeccionados nas mesmas condições descritas anteriormente, omitindo-se SDS e DTT dos tampões do gel, de amostra e de corrida.

3.2.4 - Revelação de géis por Coomassie R-250

. A coloração de géis por Coomassie R-250 seguiu o descrito por Rabilloud e Charmont (2000), com algumas modificações. Após a eletroforese, os géis foram fixados em uma solução de etanol a 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) por 30 min. Em seguida, esta solução foi descartada e substituída por uma solução de coloração contendo Coomassie R-250 a 0,2% (m/v) em etanol a 40% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v). Os géis permaneceram nesta solução, em agitação moderada, por 1h. Após este período, a solução de coloração foi descartada e a remoção do *background* foi feita com trocas sucessivas de solução fixadora por 30-60min. Por fim, adicionou-se água Milli-Q para completar a descoloração. Os géis foram estocados a 4°C em uma solução de ácido acético a 1% (v/v).

3.2.5 - Revelação de géis por Coomassie G-250

A coloração de géis por Coomassie G-250 seguiu o descrito por Rabilloud e Charmont (2000). Os géis foram fixados, sob agitação moderada, em solução de etanol 30% e ácido fosfórico 1,7% (v/v) por três ciclos de 15 min. Em seguida, a solução fixadora foi descartada e lavou-se o gel por três ciclos de 10 min com uma solução aquosa de ácido fosfórico a 1,7% (v/v). Esta solução foi removida e adicionamos 50 mL de uma solução contendo ácido fosfórico a 1,7%, etanol a 18% (v/v) e sulfato de amônio a 15% (p/v) e deixamos o gel sob agitação por 15 min. Após este período, adicionamos 500 µL de Coomassie G-250 2% (m/v) e azida sódica 0,02% (m/v) à solução anterior. O gel foi deixado sob agitação por 24-72h e o *background* foi removido com água Milli-Q.

3.2.6 - Revelação de géis por impregnação por prata

A revelação dos géis por impregnação por prata seguiu o descrito por Heukeshoven e Dernick (1985), com algumas modificações. Após a corrida eletroforética, os géis foram fixados por 30 min em solução de etanol 40% e ácido acético a 10% sob agitação. Em seguida, esta solução foi descartada e sensibilizamos os géis com 50mL de uma solução de etanol a 30% (v/v), glutaraldeído 0,5% (v/v), tiosulfato de sódio 0,2% (m/v), acetato de sódio 12% (m/v) por 30 min. Esta solução foi descartada e lavamos extensivamente os géis por 3 ciclos de 2 min com água Milli-Q. Após a lavagem, impregnamos os géis com 50mL de uma solução de nitrato de prata 0,25% (m/v), formaldeído 0,04% (v/v), tiosulfato de sódio 0,001% (m/v) por 20 min, sob agitação. Os géis foram lavados novamente com água Milli-Q por três ciclos de 20s para remover o excesso da solução anterior e revelados com 50 mL de uma solução de carbonato de sódio 2,5% (m/v), formaldeído 0,02% (v/v), tiosulfato de sódio 0,001% (m/v) em água e agitados até que se obtivesse a revelação de todas as bandas. Em seguida, esta solução foi descartada e a reação foi encerrada pela adição de 50 mL de uma solução de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5% (m/v), mantendo os géis sob agitação por 10 min. Os géis revelados foram guardados em ácido acético a 1% (v/v) em água.

3.2.7 - Revelação de glicoproteínas em géis de poliacrilamida pela técnica de ácido periódico / reagente de Schiff

Para a revelação de géis pela técnica do ácido periódico / reagente de Schiff utilizou-se kit comercial (*GelCode Glycoprotein Staining Kit*, Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. O gel foi fixado em 50 mL de metanol 50% (v/v) por 30 min e lavado por duas vezes com 100 mL de ácido acético a 3% (v/v) por 10 min cada. Em seguida, o gel foi transferido para um recipiente contendo 25mL de solução oxidante [ácido periódico a 1% (m/v) em ácido acético 3% (v/v)] e mantido sob agitação moderada, por 15 min. Após este período, o gel foi lavado por três ciclos de 5 min, com 100 mL de ácido acético a 3% (v/v). Posteriormente, o gel foi transferido para um novo recipiente contendo 25 mL de reagente de Schiff (*GelCode Glycoprotein Staining Reagent*) sob agitação moderada por 15 min. Depois, o gel foi transferido para um outro recipiente contendo 25 mL de solução redutora

[metabissulfito de sódio 0,5% (m/v)] sob agitação por 5 min. Após este passo, o gel foi lavado extensivamente com ácido acético a 3% (v/v), seguido de lavagens com água Milli-Q até ocorrer a coloração das bandas. Terminada a coloração, o gel foi guardado em uma solução de ácido acético a 3% (v/v) a 4°C.

3.2.8 - Aquisição e análise de imagens de géis de poliacrilamida

A aquisição das imagens dos géis foi feita com o auxílio do programa Adobe Photoshop Elements (Adobe Systems Incorporated) conectado a um scanner ImageScanner III (GE Healthcare). As digitalizações foram feitas em resolução de 300dpi e as imagens salvas em formato TIFF para minimizar a perda de dados devido à compressão das imagens. A análise das imagens adquiridas foi conduzida com o programa ImageMaster 2D Elite (Amersham Biosciences).

3.2.9 - Digestão trípica em gel de poliacrilamida para análise por espectrometria de massas

A digestão trípica de bandas de gel de poliacrilamida foi conduzida segundo o descrito por (Shevchenko *et al.* 1996) com algumas modificações. As bandas de interesse foram excisadas do gel e incubadas *overnight* em 200µL de uma solução contendo bicarbonato de amônio a 25 mM e acetonitrila a 50% (v/v) com o objetivo de remover Coomassie, SDS e demais reagentes que pudessem interferir na digestão enzimática. Após esta incubação, a solução foi descartada e os géis foram desidratados pela adição de 200µL de acetonitrila por 5 min. Em seguida, esta solução foi desprezada e reduzimos as pontes dissulfeto das proteínas contidas nos pedaços de gel pela adição de 100µL de uma solução de ditioneína 65mM em bicarbonato de amônio 100 mM e incubação a 56°C por 30 min. Em seguida, realizamos a alquilação das cisteínas livres adicionando 100µL de uma solução de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min à temperatura ambiente e protegido da luz. Os pedaços de gel foram lavados por dois ciclos de 10 min com 200µL de bicarbonato de amônio 100 mM para remover o excesso de ditioneína e iodoacetamida das amostras e foram desidratados novamente com acetonitrila. Os pedaços de gel foram reidratados com uma solução

de tripsina a 20 ng/ μ L (Promega, cat. #V511) em bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0 por 45 min no gelo. Após este período, o excesso de solução de tripsina foi retirado das amostras e substituído por 20 μ L de bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0 e as amostras foram mantidas *overnight* a 37°C (16-24h). Os peptídeos tripticos resultantes foram extraídos da malha do gel com ciclos de sonicação em solução de ácido fórmico 5% (v/v) e acetonitrila 50%. Os extratos peptídicos resultantes foram concentrados em centrífuga a vácuo (Speed Vac – Savant) e estocados a -20°C para posterior análise por espectrometria de massas.

3.2.10 - Análises de peptídeos por espectrometria de massas

Os extratos peptídicos concentrados foram ressolubilizados em 10 μ L de uma solução de ácido fórmico a 1% (v/v), seguido de banho ultrassônico por 10 min à temperatura ambiente. Quatro microlitros desta solução foram aplicados a uma coluna *trap* de 2 cm de comprimento (diâmetro interno de 100 μ m) empacotada com Magic C18 AQ matrix (Michrom Bioresources, USA) de 5 μ m e 200 Å, seguido de separação em coluna de 10 cm de comprimento (diâmetro interno de 75 μ m) empacotada com a mesma matriz, diretamente em um PicoTip emitter (New Objective, USA) vazio com ponta de 15 μ m de diâmetro. A cromatografia líquida foi realizada em instrumento EASY-nLC II (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram carregadas na coluna *trap* a 2000 nL/min, enquanto a separação cromatográfica ocorreu a 200 nL/min. A fase móvel A foi composta por ácido fórmico 0,1% (v/v) em água e a fase móvel B foi composta por ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrila. As condições de gradiente foram: 2 a 40% B em 52 min e até 80% B em 4 min, mantendo essa concentração por 2 min, totalizando 58 min de corrida. Os peptídeos eluídos foram introduzidos diretamente no espectrômetro de massas LTQ/Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) para serem analisados. A voltagem da fonte foi ajustada para 1.9 kV, a temperatura do capilar para 200 °C e a voltagem das *tube lens* para 100 V. Espectros MS1 foram adquiridos no analisador Orbitrap (com intervalo de *m/z* entre 300 a 1700) a 60.000 de resolução (FWHM). Para cada espectro, os 10 íons mais abundantes foram submetidos a fragmentação por CID (sinal mínimo requerido de 10.000); janela de isolamento de 2.5 *m/z*; energia de colisão normalizada em 35,0; a frequência de RF usada para fragmentar os íons foi de 0.25 (*activation Q*) com um tempo de ativação de 30 ms seguido de aquisição de MS2 no *linear trap*. A opção de exclusão dinâmica foi habilitada e ajustada com os

seguintes valores para cada parâmetro: número de repetições = 1; duração = 30 s; tamanho da lista de exclusão = 500 m/z; duração de exclusão = 45 s e uma tolerância da massa de exclusão = 10 ppm.

3.2.11 - Análises de proteínas íntegras por espectrometria de massas

A análise de proteínas íntegras por espectrometria de massas foi realizada em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (AB SCIEX TOF/TOF 5800) no modo linear. As amostras a serem analisadas foram concentradas e dessalinizadas por micro-colunas de fase reversa C4 (ZipTip C4) de acordo com as instruções do fabricante (Millipore). As amostras (0,3µL) foram aplicadas diretamente na placa de MALDI, seguido da adição de 0,3µL de matriz [ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico a 10 mg/mL em acetonitrila a 50% (v/v) e TFA a 0,3% (v/v)], de acordo com a metodologia *dried droplet*. Utilizamos os valores de m/z 22.000 (z=3), 33.000 (z=2) e 66.000 (z=1) registrado para a proteína BSA para efetuar a calibração externa do espectrômetro. Os espectros obtidos foram analisados com auxílio do programa *Data Explorer* (Applied Biosystems).

3.2.12 - Ensaio de interação entre BJ46a e SVMP por SDS-PAGE / PAGE Nativo

A interação entre BJ46a e as toxinas jararagina (metaloproteinase de classe PIII), leucurolisina-a, BaP1 e atroxlisina-I (metaloproteinases de classe PI) foi analisada através do ensaio de formação de complexos entre o inibidor e estas toxinas. Neste ensaio, BJ46a foi incubada com cada uma destas toxinas na proporção molar de 1:2 (subunidade do inibidor:toxina) por 15min à temperatura ambiente e então analisadas por eletroforese em condições nativas e desnaturantes. As bandas de interesse foram excisadas do gel, digeridas com tripsina e seu conteúdo analisado por espectrometria de massas como previamente descrito.

3.2.13 - Ensaio de inibição da atividade azocaseínolítica de jararagina por BJ46a

A enzima jararagina (5 µg) foi incubada com BJ46a em diferentes proporções molares de subunidade do inibidor para enzima (0,33:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 e 3:1) por 30 min a 37°C, em tampão Tris-HCl 10mM + NaCl 100mM pH 8,6. Em seguida, adicionaram-se 225µL de cloreto de cálcio a 45mM em todas as amostras com exceção do controle de inibição, onde adicionamos o mesmo volume de uma solução de EDTA a 45mM. Posteriormente, adicionou-se 225µL do substrato azocaseína a 0,5% (m/v, em tampão Tris-HCl 10mM + NaCl 100mM pH 8,6), seguido de uma incubação por 1h a 37°C. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de uma solução aquosa de ácido tricloroacético a 15% (v/v). Após a adição desta solução, as amostras foram centrifugadas a 14.000xg por 10 min. Alíquotas de 150µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 poços. A cada poço foram adicionados mais 150µL de uma solução de NaOH a 0,5M. A absorvância de cada amostra a 380nm foi registrada com auxílio da leitora de placas Versa Max Microplate Reader (Molecular Devices). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados de cada ensaio foram expressos como a média de absorvância de cada amostra, subtraída da média de absorvância registrada para a amostra branco.

3.2.14 - Ensaio de inibição da atividade fibrinogenolítica de metaloproteinasas de venenos de serpentes por BJ46a

O inibidor BJ46a foi incubado com as SVMP atroxlisina-I, leucurolisina-a e BaP1 em duas proporções molares de subunidade de inibidor para toxina (1:1 e 2:1) por 10 min a 37°C, em tampão Tris-HCl 20mM + CaCl₂ 20mM + NaCl 150mM pH 7,5. Após este período, adicionamos 10µg de fibrinogênio bovino (Sigma; Fraction type I-S, 5 mg/mL em tampão Tris-HCl 20mM + CaCl₂ 20mM + NaCl 150mM pH 7,5) e os volumes ajustados para 6,2 µL com o mesmo tampão e as amostras foram novamente incubadas por 10 min a 37°C. Como controle negativo da hidrólise do fibrinogênio, incubamos cada toxina com EDTA (concentração final de 20mM). A reação foi interrompida adicionando-se 6,2µL tampão de amostra duas vezes concentrado [Tris-Hcl 0,12M pH 6,8, SDS 2% (m/v), DTT 40mM, glicerol a 20% (v/v) e azul de bromofenol a 0,05% (m/v)], seguida de fervura por 5 min. As

amostras foram analisadas em SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras, e os géis foram corados por Coomassie R-250.

3.2.15 - Ensaio de interação entre BJ46a e jararagina por cromatografia de exclusão molecular

A interação entre BJ46a e jararagina foi analisada por cromatografia de exclusão molecular, de acordo com o descrito por (Valente *et al.* 2001). Diferentes proporções molares de subunidade de BJ46a para jararagina (0,33:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 e 3:1, em tampão Tris-HCl 20mM + CaCl₂ 20mM + NaCl 150mM pH 7,5) foram incubadas a 37°C por 30min e submetidas à cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 HR 10/30 (300x10mm – Amersham Biosciences) a 0,5 mL/min em tampão Tris-HCl 20mM + CaCl₂ 20mM + NaCl 150mM pH 7,5 em sistema cromatográfico Äkta Purifier (Amersham Biosciences), sendo a absorvância monitorada a 215nm. As áreas dos picos resultantes de cada análise foram integradas com auxílio do software UNICORN (GE Healthcare).

3.2.16 - Desglicosilação de BJ46a em condições desnaturantes e redutoras pela glicosidase PNGase F

As reações de desglicosilação enzimática com PNGase F (Sigma-Aldrich, cat.no. P7367-300UN) foram conduzidas de acordo com os protocolos abaixo:

- Protocolo 1: Alíquotas liofilizadas de BJ46a e α -1 glicoproteína ácida humana (40 μ g) foram solubilizadas em 40 μ L de uma solução de 0,25% (m/v) do surfactante RapiGest SF (Waters) em bicarbonato de amônio 50mM pH 8,0. Em seguida, adicionou-se 1 μ L de uma solução de DTT 1M para uma concentração final de 25mM e as amostras foram incubadas por 45 min a 56°C. Em seguida, as pontes dissulfeto foram alquiladas pela adição de 6 μ L de uma solução de iodoacetamida a 0,5M (concentração final de iodoacetamida: 67mM) e incubadas por 15 min à temperatura ambiente, protegida da luz. Posteriormente, adicionou-se PNGase F na proporção de 0,5U por micrograma de glicoproteína. As amostras foram incubadas por 3h a

37°C e a reação foi encerrada pela incubação das amostras a 100°C por 5 min.

- Protocolo 2: Amostras de BJ46a (8µg) foram solubilizadas com o surfactante RapiGest SF (Waters), nas concentrações de 0,25% (p/v) e 0,063% (p/v) em bicarbonato de amônio 50mM pH 8,0 e incubadas por 10 min à temperatura ambiente, em um volume final de reação de 16µL. Em seguida, 10µL de cada reação foram transferidos para um novo tubo. A estes, adicionamos 0,2µL de DTT 1M para uma concentração final de 20mM e então incubamos todas as amostras por 3h a 37°C. Posteriormente, adicionamos às amostras reduzidas com DTT 1,4µL de iodoacetamida a 0,5M para uma concentração final de 60mM seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz Adicionou-se PNGase F na proporção de 0,5U de enzima por micrograma de glicoproteína. As amostras foram incubadas a 37°C e alíquotas foram removidas nos tempos de 1 e 3h e analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras.
- Protocolo 3: Amostras de α-1 glicoproteína ácida humana e BJ46a (22µg) foram incubadas com uma solução contendo RapiGest SF a 0,063% (m/v) em bicarbonato de amônio 50mM pH 8,0 e incubadas por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 0,9µL de DTT a 1M para uma concentração final de 20mM e incubou-se por 1h à 37°C. Após este período, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e então adicionou-se 5,9µL uma solução de iodoacetamida 0,5M para uma concentração final de 60mM e incubamos as amostras por 15 min à temperatura ambiente, protegida da luz. Após a alquilação das amostras com iodoacetamida, as amostras foram subdividas em tubos contendo o equivalente a 5µg de proteína e acrescentamos PNGase F nas proporções de 0,25, 0,5 e 1U por micrograma de glicoproteína e as amostras foram incubadas por 2h a 37°C e analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras.

3.2.17- Ensaio de desglicosilação enzimática de BJ46a pela endoglicosidase H¹

As proteínas ovoalbumina, BSA e BJ46a (1µg cada) foram desnaturadas, sob fervura, em solução contendo SDS a 0,5% (m/v) e DTT a 40mM por 5 min. Em seguida, adicionou-se 2µL de uma solução contendo citrato de sódio 0,5M pH 5,5 e Endo H para as proporções de 12,5U/µg e 500U/µg de glicoproteína. A reação transcorreu por 1h a 37°C. O conteúdo de cada reação foi analisado por SDS-PAGE em condições redutoras corado por impregnação por prata, como descrito.

¹ - Clonada de *Streptomyces plicatus* e expressa em *E.coli*. Provedor: New England Biolabs, cód. P0702S. Atividade específica: 500.000U/mL.

3.2.18 - Desglicosilação sequencial de BJ46a em condições nativas por exoglicosidases

- Desglicosilação por α -(2→3,6,8,9) neuraminidase ¹: A reação transcorreu por 1h, a 37°C, em tampão fosfato de sódio 25mM pH 7,0 na proporção de 0,0002U de neuraminidase por micrograma de glicoproteína.
- β -(1→4) galactosidase ²: A reação transcorreu por 6h a 37°C, em tampão fosfato de sódio 25mM pH 7,0 na proporção de 0,00015U de galactosidase por micrograma de glicoproteína.
- β -N-acetilglicosaminidase ³: A reação transcorreu por 24h a 37°C, em tampão fosfato de sódio 25mM pH 7,0 na proporção de 0,0008U de β -N-acetilglicosaminidase por micrograma de glicoproteína.

¹ Neuraminidase: clonada de *Arthrobacter ureafaciens* e expressa em *E.coli*. Provedor: Sigma-Aldrich, cód. N8271. Atividade específica: 5U/mL.

² β -(1→4) galactosidase: clonada de *Streptococcus pneumoniae* e expressa em *E.coli*. Provedor: Sigma-Aldrich, cód. G0413. Atividade específica: 3U/mL.

³ β -N-acetilglicosaminidase: clonada de *Streptococcus pneumoniae* e expressa em *E.coli*. Provedor: Sigma-Aldrich, cód. A6805. Atividade específica: 40U/mL.

3.2.19 - Desglicosilação de BJ46a em condições nativas

A desglicosilação de BJ46a em condições nativas foi realizada adicionando-se as enzimas neuraminidase, β -(1 \rightarrow 4) galactosidase, β -N-acetilglicosaminidase e PNGase F nas proporções de 0,00006U, 0,000035U, 0,00046U e 0,06U por micrograma de glicoproteína, respectivamente. Após a adição das enzimas, as amostras foram incubadas por 72h a 37°C.

3.2.20 - Investigação dos sítios de N-glicosilação em BJ46a

Para a investigação dos sítios de N-glicosilação de BJ46a, 2 μ g das proteínas BSA, α 1-glicoproteína ácida humana e BJ46a foram submetidos à eletroforese em condições desnaturantes e redutoras. As bandas correspondentes a cada proteína foram excisadas do gel, digeridas com tripsina e os peptídeos trípticos foram extraídos do gel de poliacrilamida por dois ciclos de sonicação por 10 min em bicarbonato de amônio 50mM pH 8,0 e então aquecidos a 100°C por 10 min para inativação da tripsina. Uma alíquota (20 μ L) do hidrolisado tríptico de cada proteína foi desglicosilada com 0,5U de PNGase F por 1h a 37°C e posteriormente digerido com 20ng de ácido aspártico aminopeptidase (Asp-N ; 20ng/ μ L em água MilliQ - Roche) por 12h a 37°C. Uma segunda alíquota de mesmo volume foi digerida somente com Asp-N pelo mesmo período e temperatura. Todas as amostras foram submetidas à análise por espectrometria de massas e os dados gerados foram analisados pelo software PEAKS 6.

3.2.21 - Análises computacionais pelo software PEAKS 6

Os dados de espectrometria de massas gerados neste trabalho foram analisados com o auxílio do programa PEAKS 6 (Bioinformatics Solutions, Inc. Canada). Para todas as análises, estabelecemos o limite de tolerância de acurácia em 10ppm para os íons precursores e 0,6Da para os íons-fragmento; consideramos que a clivagem foi semi-tríplica e que ocorreram no máximo duas clivagens perdidas por proteína. Quando aplicável, as clivagens por Asp-N ou pela combinação tripsina+Asp-N foram selecionadas. Iniciamos nossa análise utilizando a ferramenta *de novo*, que sequencia os peptídeos sem o auxílio do banco de dados; aceitamos modificações variáveis em cisteína (carbamidocisteína e propionamidocisteína: +57,02 e +71,04 Da respectivamente), metionina, histidina e triptofano (oxidação: +15,99Da), ácido glutâmico e glutamina (piroglutamato: - 17Da), em um máximo de três modificações por peptídeo sequenciado. Após o sequenciamento *de novo*, utilizamos a ferramenta PEAKS DB para realizarmos a busca contra o banco de dados SwissProt de 15/11/2012. Os parâmetros para a busca no banco de dados seguiram o descrito para a análise com a ferramenta *de novo*. Posteriormente, as modificações pós-traducionais foram analisadas com o auxílio da ferramenta PTM FINDER. Todas as buscas foram realizadas contra a mesma base de dados utilizada para a análise com a ferramenta PEAKS DB. Finalmente, os dados de todas as ferramentas de busca foram consolidados; o valor de $-10\log P$ equivalente a um FDR de 1% foi adotado como critério para refinar os resultados encontrados.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Purificação do inibidor de metaloproteinases BJ46a

Originalmente, a purificação do inibidor BJ46a envolve uma série de passos purificativos: precipitação fracionada por sulfato de amônio, cromatografia de interação hidrofóbica e duas cromatografias sequenciais de fase reversa. Apesar deste método levar à obtenção do inibidor com um alto grau de homogeneidade, seu rendimento purificativo em termos de quantidade de proteína é de apenas 0,55% (Valente *et al.* 2001). Foram testadas anteriormente várias abordagens diferentes, comparativamente ao método original, para aumentar o rendimento purificativo de BJ46a, como precipitação fracionada por etanol ao invés de sulfato de amônio, e cromatografia de afinidade previamente à cromatografia de fase reversa. Por diferentes razões, nenhuma das abordagens testadas foi capaz de aumentar o rendimento purificativo.

Neste trabalho, decidimos estabelecer uma nova metodologia de purificação de BJ46a, baseada no método original. Iniciamos a otimização do método modificando o gradiente de separação da cromatografia de fase reversa. Na abordagem originalmente publicada, as frações enriquecidas em BJ46a oriundas da cromatografia de interação hidrofóbica foram submetidas a cromatografia de fase reversa em coluna C4, em um gradiente linear de 25% a 100% de acetonitrila em 89 min e as frações coletadas foram recromatografadas nas mesmas condições para a obtenção de BJ46a homogênea (Valente *et al.* 2001). Estabelecemos um novo gradiente considerando a porcentagem de solvente B necessária para a eluição de BJ46a ($\approx 45\%$ B). (capítulo materiais e métodos, seção 3.2.1). Utilizando este gradiente, foi possível obter BJ46a com um grau de homogeneidade satisfatório sem a necessidade de uma recromatografia em fase reversa, mas apenas esta modificação na metodologia original de purificação de BJ46a não foi suficiente para aumentar o rendimento purificativo.

Partimos para uma segunda abordagem para a purificação do inibidor, e submetendo o plasma diretamente à cromatografia de interação hidrofóbica, sem precipitação prévia da amostra por sulfato de amônio (**Figura 5**). A análise das frações cromatográficas obtidas foi realizada por eletroforese em condições

desnaturantes e redutoras. Baseando-nos na massa molecular aparente de BJ46a por SDS-PAGE (≈ 55 kDa), as frações cromatográficas mais enriquecidas em proteínas nesta faixa de massa molecular foram unidas em 6 diferentes *pools* e novamente analisadas por eletroforese em condições desnaturantes e redutoras (**Figura 6**). Ao compararmos estes *pools* de frações cromatográficas com o plasma bruto de *B. jararaca*, percebemos um maior grau de enriquecimento na faixa de massa molecular aparente de BJ46a, embora ainda haja alguns contaminantes minoritários de maior e menor massa molecular.

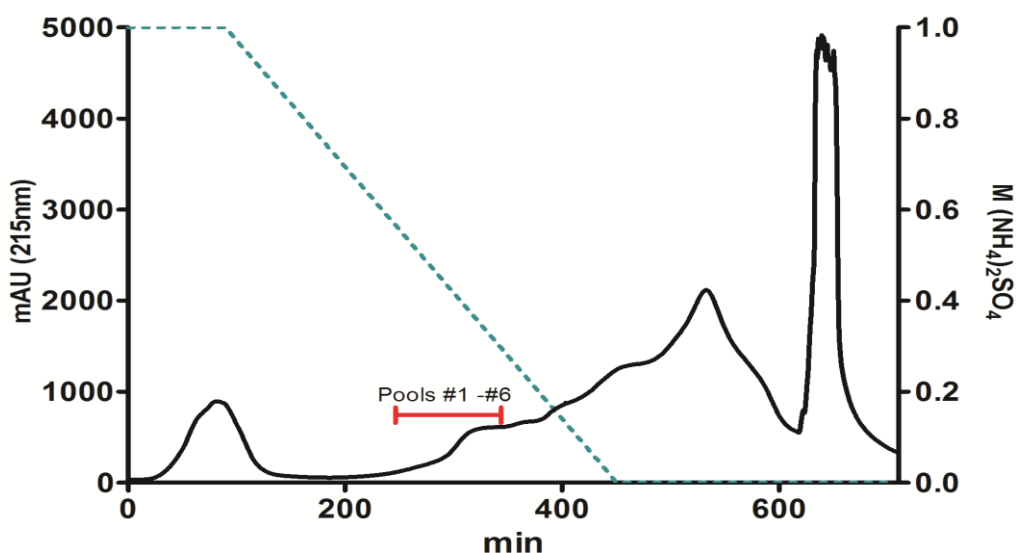


Figura 5: Cromatografia de interação hidrofóbica do plasma de *Bothrops jararaca* sem precipitação prévia por sulfato de amônio.

A cromatografia foi realizada em coluna Phenyl Sepharose CL-4B (16 x 250mm) utilizando-se sistema cromatográfico Äkta Purifier (Amersham Biosciences). O traçado em vermelho indica a região cromatográfica das frações mais enriquecidas em BJ46a (pools #1 a #6).

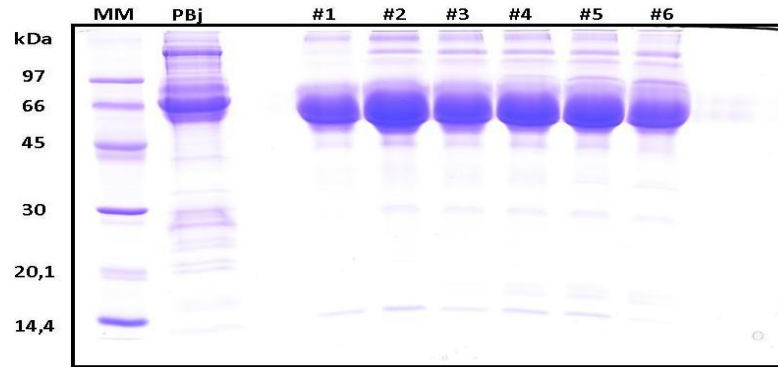


Figura 6: SDS-PAGE dos *pools* de frações cromatográficas oriundas da cromatografia de interação hidrofóbica do plasma de *B. jararaca* sem precipitação prévia por sulfato de amônio.

PBj = Plasma de *B. jararaca* (9µg); #1- #6: *pools* de frações cromatográficas enriquecidas em BJ46a (15µg); MM = marcador de massa molecular. Corado por Coomassie R-250.

Todos os *pools* foram então precipitados por sulfato de amônio a 80% de saturação, ressolubilizados em um mililitro de uma solução aquosa de TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila a 5% (v/v) e então injetados em uma coluna de fase reversa C4, gerando os perfis cromatográficos representados na **Figura 7**. O pico majoritário de cada amostra foi coletado e imediatamente liofilizado, ressuspenso em uma solução de fosfato de sódio a 10mM pH 7,0 e analisado por SDS-PAGE corado por impregnação por prata (**Figura 8**). Usando esta estratégia purificativa, obtivemos 1,18 miligramas de BJ46a em sua forma homogênea (**Tabela 1**). Esta abordagem purificativa permitiu a obtenção do inibidor com menor manipulação de amostra e rendimento purificativo próximo ao originalmente descrito, de 0,55% (Valente *et al.* 2001).

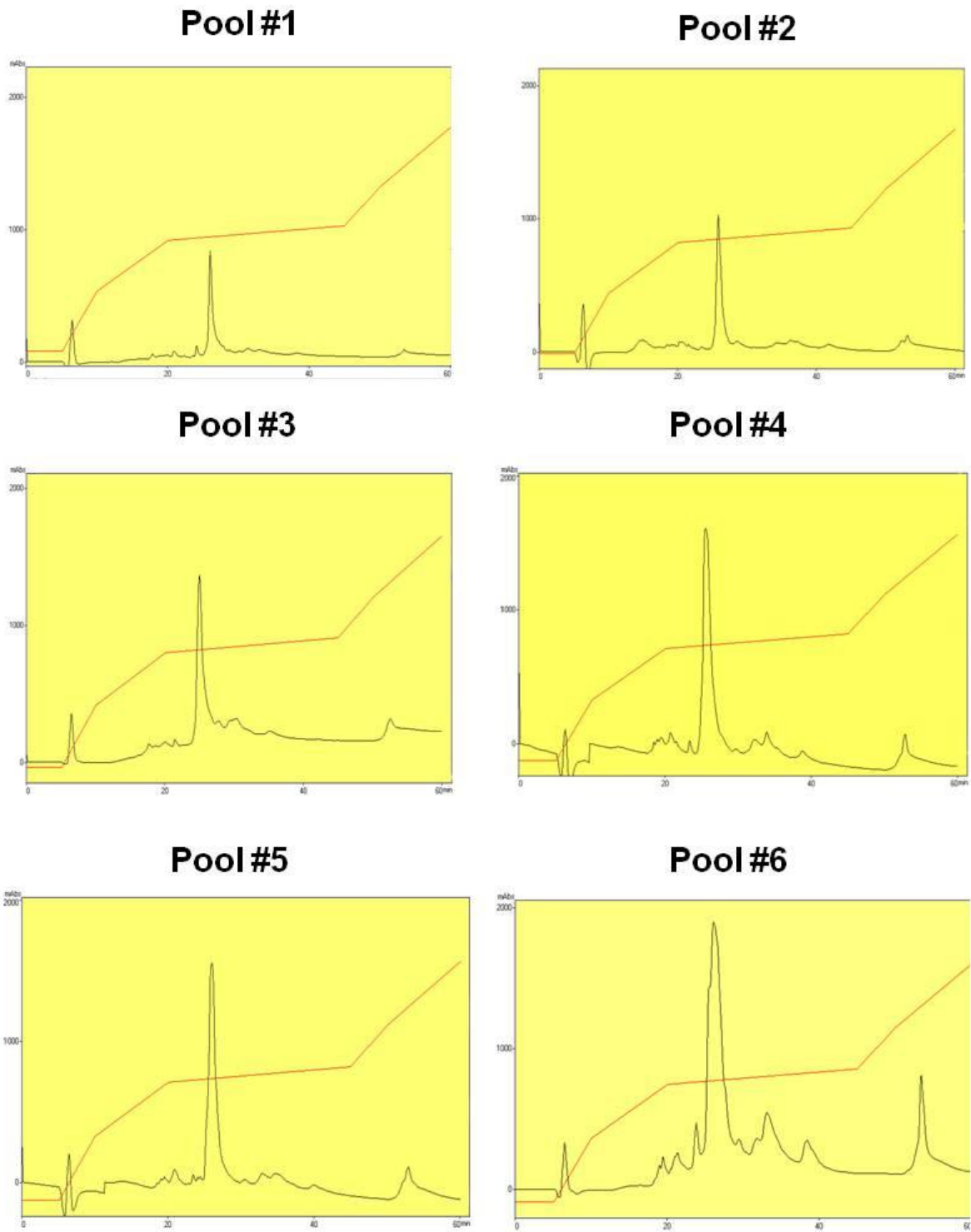


Figura 7: Perfis cromatográficos resultantes da separação dos pools #1, #2, #3, #4 #5 e #6 (figura 6) por cromatografia de fase reversa em coluna C4 (10 x 250mm).

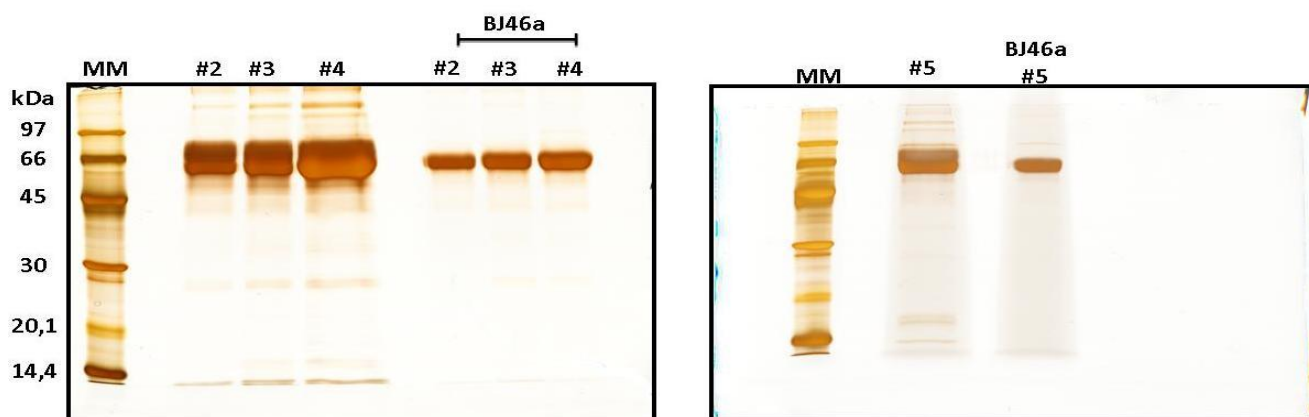


Figura 8: SDS-PAGE das frações cromatográficas coletadas durante a separação cromatográfica dos pools por cromatografia de fase reversa.

Os pools #2, #3, #4 e #5 foram obtidos como mostrado na figura 4; BJ46a #2,#3,#4 e #5: frações homogêneas em BJ46a isoladas dos respectivos pools (2 μ g – figura 6); MM = marcador de massa molecular. Corado por impregnação por prata.

Tabela 1: Rendimento da purificação de BJ46a sem precipitação prévia do plasma de *B. jararaca* por sulfato de amônio

Etapa purificativa	Quantidade de proteína (mg)	Rendimento (%)	Método original (Valente <i>et al.</i> 2001)
Plasma <i>Bothrops jararaca</i> filtrado 0,45 μ m (10mL)	278,67	100,00	
Plasma em 0,1M fosfato de sódio + 1M sulfato de amônio pH 7,0	183,00	68,00	
Cromatografia de Interação Hidrofóbica em coluna Phenyl Sepharose CL-4B (16 x 250mm)	7,30	2,60	
Cromatografia de fase reversa em coluna C4 (10 x 250mm)	1,18	0,42	0,55

4.2 - Análise da interação de BJ46a com diferentes metaloproteínas de venenos de serpentes

Em trabalho anterior, demonstrou-se que BJ46a é capaz de interagir com as metaloproteínas jararagina e atrolisina-C, mas nenhuma formação de complexo foi observada com jararagina-C, um produto de degradação de jararagina contendo apenas os domínios desintegrina e rico em cisteína, indicando que o domínio metaloproteínase é fundamental para a interação inibidor-toxina (Valente *et al.* 2001). Com o objetivo de ampliar a caracterização do perfil inibitório de BJ46a frente às metaloproteínas de venenos de serpentes, neste trabalho analisamos a interação de BJ46a frente a três SVMP de classe PI e analisamos novamente a interação do inibidor com a SVMP de classe PIII jararagina.

As SVMP de classe PI apresentam apenas o domínio catalítico e muitas apresentam estrutura cristalográfica determinada, o que pode fornecer informações valiosas sobre os determinantes estruturais da inibição de metaloproteínas de venenos de serpentes por BJ46a. Neste estudo, selecionamos três SVMP de classe PI: atroxlisina-I (isolada do veneno de *Bothrops atrox*), leucurolisina-a (isolada do veneno de *B. leucurus*) e BaP1 (isolada do veneno de *B. asper*). Iniciamos nossa análise realizando ensaios de interação entre BJ46a e cada uma destas toxinas por eletroforese em condições desnaturantes (na presença e na ausência de 100mM DTT) e por eletroforese em condições nativas.

Nestes ensaios, BJ46a foi incubada com cada uma destas toxinas em uma proporção molar de 1:2 (subunidade do inibidor:toxina) por 15 min à temperatura ambiente. Quando submetemos uma alíquota destas amostras à eletroforese em condições nativas (**Figura 9**, painel A) é possível visualizar a ocorrência de novas bandas nas raias 2 e 4, de menor migração eletroforética em relação a banda de BJ46a controle (raia 1) e aos controles das toxinas isoladas (raias 3 e 5), sugerindo a interação entre BJ46a e atroxlisina-I na raia 2, assim como entre BJ46a – BaP1 na raia 4. Para BJ46a e leucurolisina-a, não evidenciamos nenhuma formação de complexo entre estas duas proteínas (raia 6).

Quando analisamos estas amostras por SDS-PAGE em condições não redutoras (**Figura 9**, painel B), as bandas referentes aos complexos inibidor-toxina não são mais visualizadas, indicando que esta interação é mantida por forças de natureza não-covalente. Análises por espectrometria de massas indicaram

peptídeos pertencentes tanto ao inibidor BJ46a quanto às toxinas BaP1 e atroxlisina-I nas amostras 2 e 4 do gel nativo (**Tabela 2**), reforçando a evidência da formação de complexo entre BJ46a as toxinas BaP1 e atroxlisina-I.

Entretanto, notamos uma aparente degradação de BJ46a no gel SDS-PAGE (**Figura 9**, raia 2, painel C), indicando que, apesar de ocorrer a interação entre as duas proteínas no gel em condições nativas (**Figura 9**, painel A, raia 2) , BaP1 foi capaz de hidrolisar o inibidor. Esta hidrólise de BJ46a por BaP1 se torna ainda mais evidente quando analisamos o complexo entre estas duas proteínas por SDS-PAGE na ausência de agente redutor (painel B, raia 2), indicando a importância das pontes dissulfeto para manutenção da estrutura tridimensional da toxina e, conseqüentemente, sua atividade catalítica.

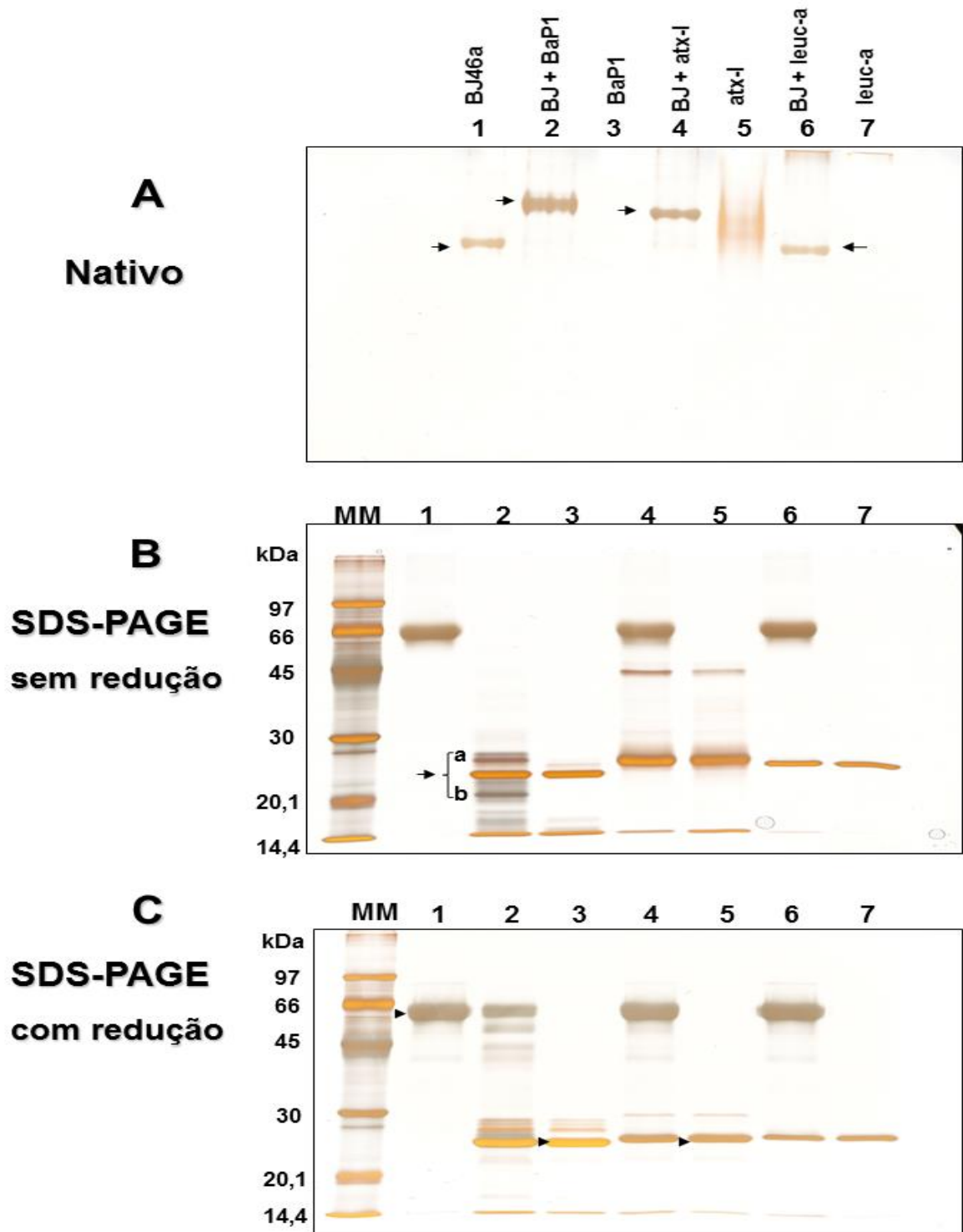


Figura 9: SDS-PAGE e PAGE Nativo dos complexos entre BJ46a e as toxinas BaP1, leucurolisina-a e atroxlisina-I.

Raia 1: BJ46a (2 μ g); 2: Complexo BJ46a + BaP1; 3: BaP1 (2 μ g); 4: Complexo BJ46a + atroxlisina-I; 5: atroxlisina-I (2 μ g); 6: Complexo BJ46a: leucurolisina-a; 7: leucurolisina-a (2 μ g). Géis corados por impregnação por prata. As bandas indicadas com setas foram excisadas e seu conteúdo identificado por espectrometria de massas (tabela 2).

Tabela 2: Identificação do conteúdo protéico das bandas excisadas dos géis exibidos na figura 9 por Orbitrap.

	Amostra	Nº de acesso (gi)	- 10log P (PEAKS)	Cobertura (%)	Nº de peptídeos	Massa teórica (Da)	Descrição
Gel Nativo (painel A)	Raia 1	48428681	429.01	78%	97	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
		24104251	379.78	98%	77	22.745	PI Snake Venom Metalloproteinase BaP1
	Raia 2	48428681	385.52	78%	93	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
		353526296	410.17	90%	79	22.918	Zinc metalloproteinase atroxlysin-I
	Raia 4	48428681	398.60	75%	93	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
	Raia 6	48428681	460.24	84%	84	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
SDS-PAGE sem redução (painel B)		240104251	305.61	72%	20	22.745	PI Snake venom Metalloproteinase BaP1
	Raia 2, banda a	48428681	285.64	43%	29	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
	Raia 2, banda b	48428681	319.66	59%	43	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
	Raia 3	240104251	421.82	98%	88	22.745	PI Snake Venom Metalloproteinase BaP1
SDS-PAGE com redução (painel C)	Raia 1	48428681	472.70	77%	104	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
	Raia 3	240104251	445.97	98%	98	22.745	PI Snake Venom Metalloproteinase BaP1
	Raia 5	353526296	442.13	99%	102	22.918	Zinc metalloproteinase atroxlysin-I

Uma vez evidenciada a interação de BJ46a com BaP1 e atroxlisina-I, decidimos investigar se BJ46a é capaz de não só interagir, mas também inibir a atividade proteolítica destas toxinas. Para isso, realizamos um ensaio de atividade fibrinogenolítica com cada uma das SVMP de classe PI testadas no ensaio anterior.

Muitas metaloproteinases de venenos de serpentes possuem a capacidade de hidrolisar o fibrinogênio, glicoproteína essencial para o processo de coagulação sanguínea. O fibrinogênio é formado por três cadeias polipeptídicas denominadas de $\text{A}\alpha$ (63,5 kDa), $\text{B}\beta$ (56 kDa) e γ (47 kDa), unidas entre si por pontes dissulfeto (Cominetti 2007). As SVMP degradam preferencialmente as cadeias $\text{A}\alpha$ e $\text{B}\beta$ do fibrinogênio (Swenson e Markland Jr 2005). Para estudarmos a atividade fibrinogenolítica destas toxinas, analisamos a degradação da molécula de fibrinogênio por meio de SDS-PAGE em condições redutoras. As amostras são previamente incubadas com fibrinogênio bovino, na presença ou ausência de inibidores por 10 min a 37°C e a reação é interrompida pela adição de uma solução desnaturante contendo SDS e DTT (Cominetti 2007).

Com relação à atroxlisina-I, a toxina foi capaz de degradar as cadeias $\text{A}\alpha$ e $\text{B}\beta$ do fibrinogênio, o que é compatível com a literatura, que indica que atroxlisina-I é uma α -fibrinogenase, SVMP que degrada a cadeia α (preferencial) e a cadeia β do fibrinogênio (Sanchez *et al.* 2010). A hidrólise do fibrinogênio por esta SVMP foi inibida quando incubamos a toxina na presença de 20mM EDTA (**Figura 10**, painel A, raias 2 e 4) Quando incubamos BJ46a e atroxlisina-I previamente à adição de fibrinogênio, a ausência de produtos de degradação do fibrinogênio nestas amostras indica que BJ46a foi capaz de inibir a atividade fibrinogenolítica de atroxlisina-I (**Figura 10**, painel A, raias 5 e 6). BJ46a também foi capaz de inibir a atividade α -fibrinogenolítica de BaP1 em ambas as proporções enzima/inibidor testadas (**Figura 10**, gel BaP1, raias 5 e 6).

Leucurolisina-a foi capaz de degradar as cadeias $\text{A}\alpha$ e $\text{B}\beta$ do fibrinogênio, como já visto anteriormente na literatura, e sua atividade também foi inibida ao ser incubada com 20mM EDTA (Gutierrez *et al.* 1995) (**Figura 10**, painel C, raias 2 e 4).

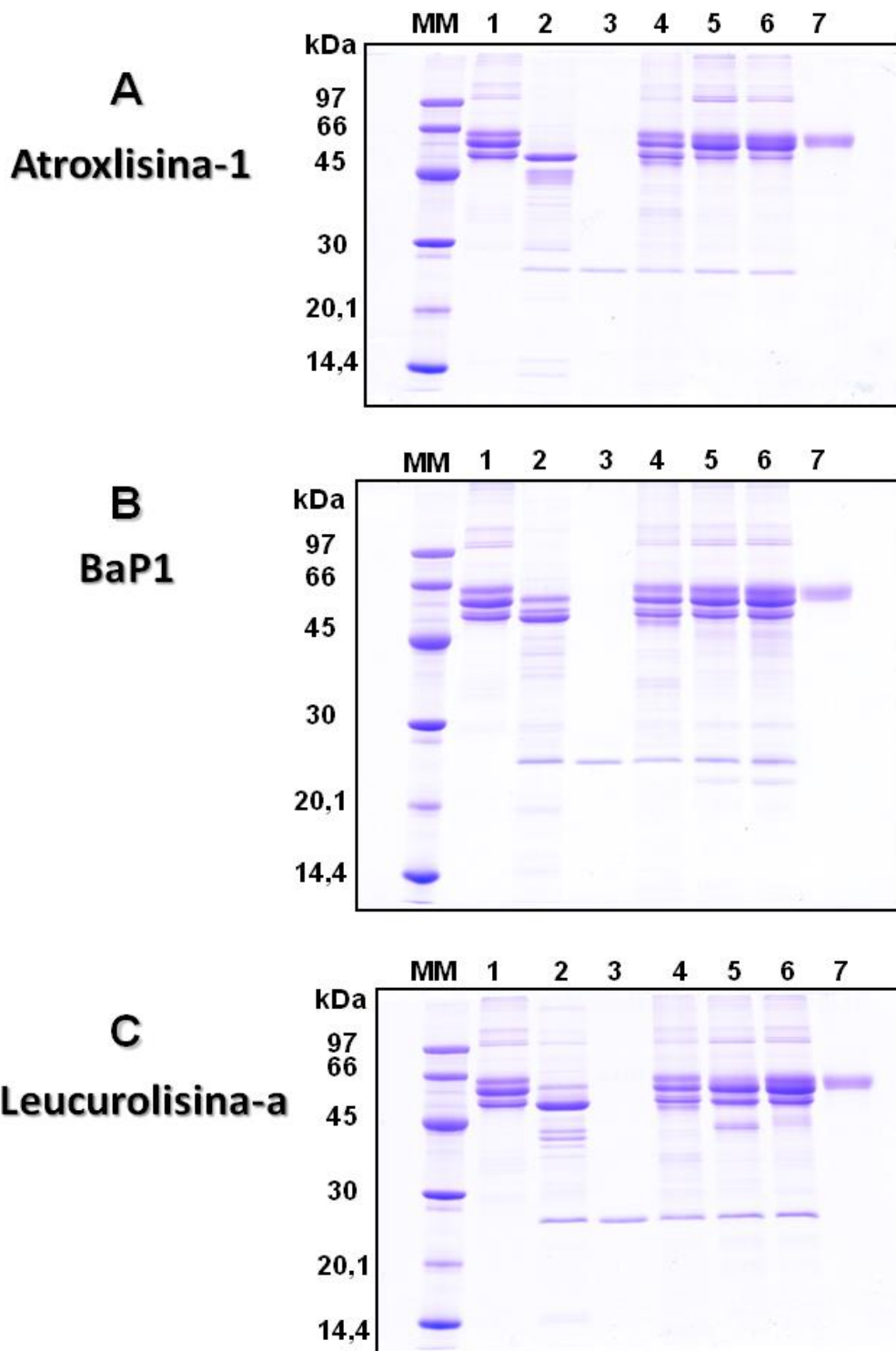


Figura 10: Ensaio de inibição da atividade fibrinogenolítica das SVMP atroxlisina-I, BaP1 e leucurolisina-a por BJ46a.

Raia 1: Fibrinogênio (10 μ g); 2: Fibrinogênio + SVMP (0,5 μ g) ; 3: SVMP; 4: Fibrinogênio + SVMP na presença de 20mM EDTA; 5: Fibrinogênio + SVMP (0,5 μ g) + BJ46a (1 μ g) (relação molar de 1:1) 6: Fibrinogênio + SVMP (0,5 μ g) + BJ46a (2 μ g) (relação molar de 1:2); 7: BJ46a controle (1 μ g). Corado por Coomassie R-250.

BJ46a foi capaz de inibir parcialmente a atividade fibrinogenolítica desta toxina (**Figura 10**, painel C, raias 5 e 6). Este é um resultado interessante, visto que não tínhamos evidência da interação do inibidor com esta SVMP nos ensaios de formação de complexo por PAGE Nativo (**Figura 9**). Porém, dados preliminares utilizando cromatografia de exclusão molecular reforçaram a evidência do complexo entre leucurolisina-a e BJ46a.

Posteriormente, analisamos a interação entre BJ46a e a metaloproteinase jararagina por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. Diferentes proporções molares de inibidor:toxina (0,33:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 e 3:1) foram incubadas por 30min a 37°C em tampão Tris-HCl 20mM + CaCl₂ 20mM + NaCl 150mM pH 7,0 e então injetadas na coluna previamente equilibrada com o mesmo tampão.

A **Figura 11** demonstra os perfis cromatográficos obtidos para cada controle e a proporção inibidor:toxina testada. Ao incubarmos BJ46a e jararagina na proporção de 0,33:1 (mol/mol), verificamos a presença de um pico de retenção distinta dos picos registrados nas amostras controles, e que corresponde ao complexo entre estas duas proteínas (**Figura 12**). Na proporção de 0,5:1, a área do pico correspondente ao complexo inibidor-toxina aumenta em relação à área do pico registrado para a proporção de 0,33:1. Porém, a presença de jararagina livre em ambas as proporções indica que a saturação do complexo ainda não foi atingida nestas relações molares. Na proporção de 1:1, o pico referente ao complexo se torna majoritário; além disso, a presença de BJ46a livre nas proporções de 2:1 e 3:1 indica que a saturação do complexo se deu na proporção de 1:1, e a massa molecular do complexo nesta relação foi calculada em 126kDa (**Figura 13**).

É interessante notar que a saturação do complexo ocorreu em uma relação diferente da encontrada na literatura, onde uma subunidade do inibidor é capaz de complexar duas moléculas de toxina (Valente *et al.* 2001). O inibidor HSF (*habu serum factor*), é um inibidor de metaloproteinases de venenos de serpentes isolado do plasma da serpente *Trimeresurus (Protobothrops) flavoviridis* que apresenta 85% de identidade de sequência para com BJ46a (Valente *et al.* 2009). Para HSF, Deshimaru e colaboradores demonstraram que o inibidor é capaz de interagir com HR6, uma SVMP isolada do veneno de *Gloydius halys brevicaudus* também na proporção de 1:1 (Deshimaru *et al.* 2005).

Além disso, BJ46a foi capaz de inibir apenas parcialmente (44,8%) a atividade proteolítica de jararagina sobre azocaseína na proporção molar de 0,5:1 (inibidor:toxina- **Figura 14**). Na proporção molar de 1:1 ocorre inibição significativa da atividade da toxina (84,6%), enquanto que nas proporções de 2:1 e 3:1 ocorre inibição total da atividade azocaseínolítica (98,9 e 98,3%, respectivamente). Estes resultados são compatíveis com o observado no ensaio anterior, no qual não verificamos a presença de jararagina livre nestas proporções de inibidor:toxina (**Figura 11**).

Até o momento, não possuímos evidências experimentais que justifiquem a diferença na estequiometria da interação entre BJ46a e a SVMP jararagina evidenciada neste trabalho, com os resultados obtidos previamente por Valente e colaboradores (Valente *et al.* 2001).

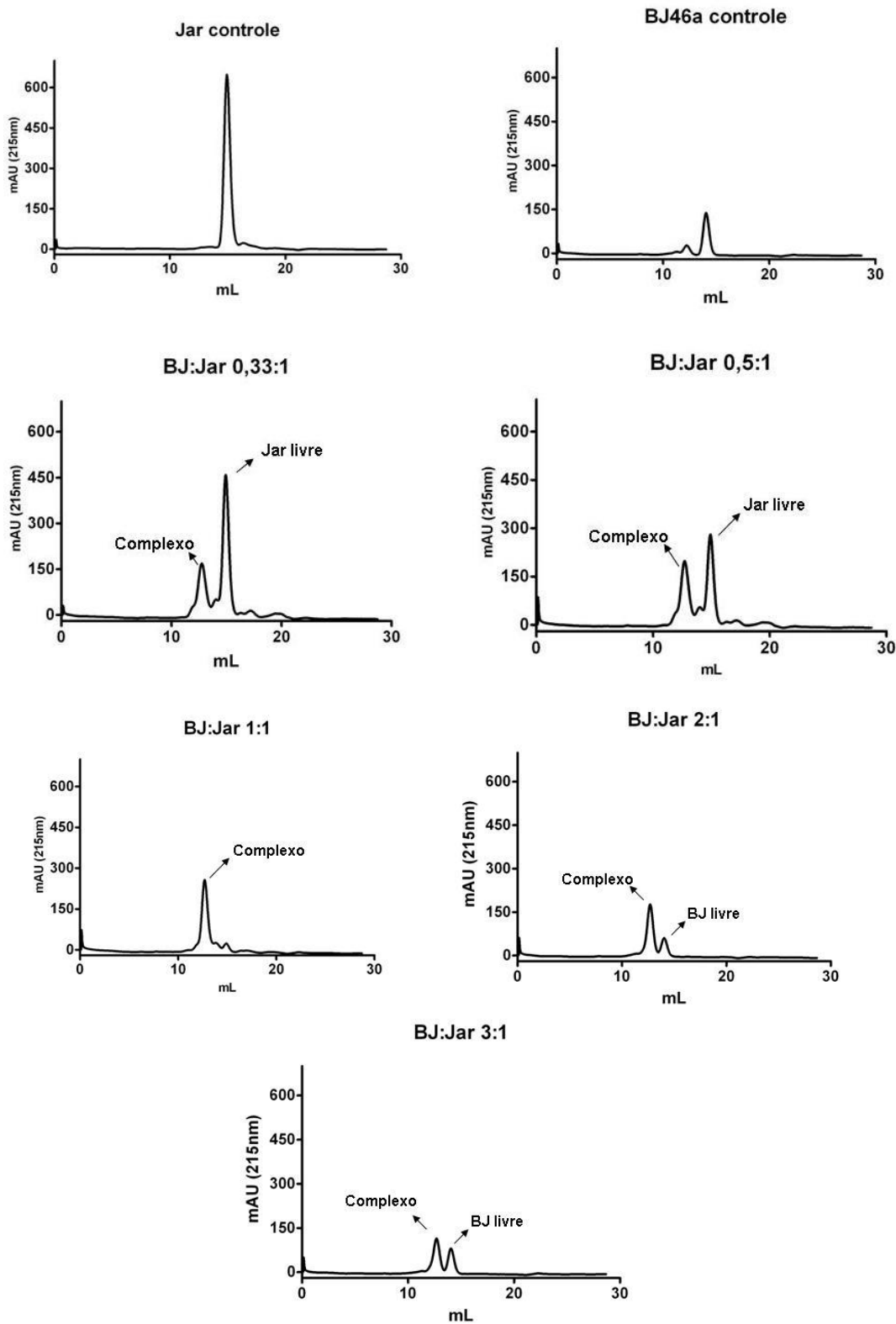


Figura 11: Perfis cromatográficos obtidos para Jararagina, BJ46a e diferentes proporções de inibidor: toxina por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200.

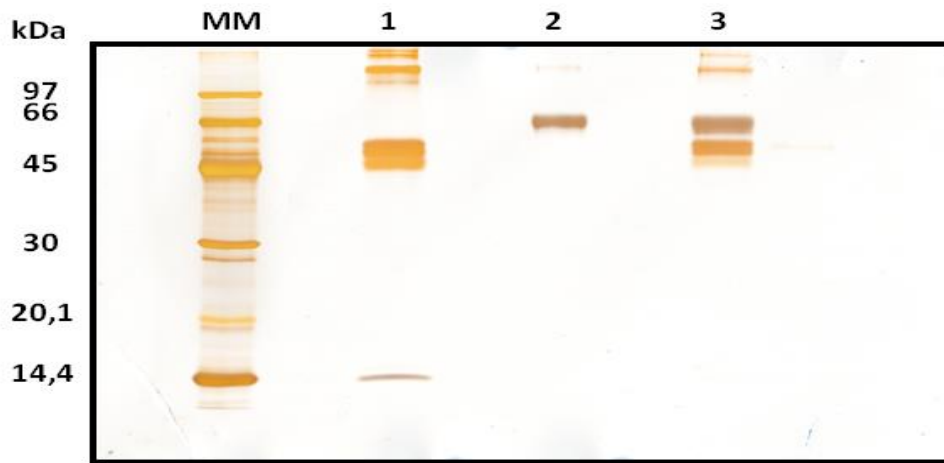
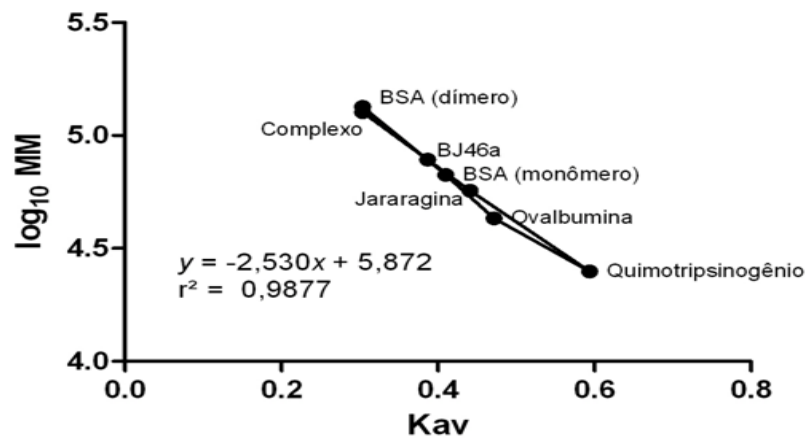


Figura 12: SDS-PAGE em condições não-redutoras das frações coletadas do experimento de interação entre BJ46a e jararagina por cromatografia de exclusão molecular.

Raia 1: Jararagina controle; Raia 2: BJ46a controle ; Raia 3: Complexo BJ46a + Jararagina (1:1). Corado por impregnação por prata.



	Volume eluição (mL)	K_{av}	$\log_{10} MM$	MM (kDa)	MM (kDa) (Valente <i>et al.</i> 2001)
Jararagina	14,9	0,440	4,759	57	57
BJ46a	14,0	0,384	4,899	79	79
Complexo	12,7	0,304	5,102	126	128

Figura 13: Determinação da massa molecular de jararagina, BJ46a e o complexo entre estas duas proteínas na proporção de 1:1 por Superdex 200.

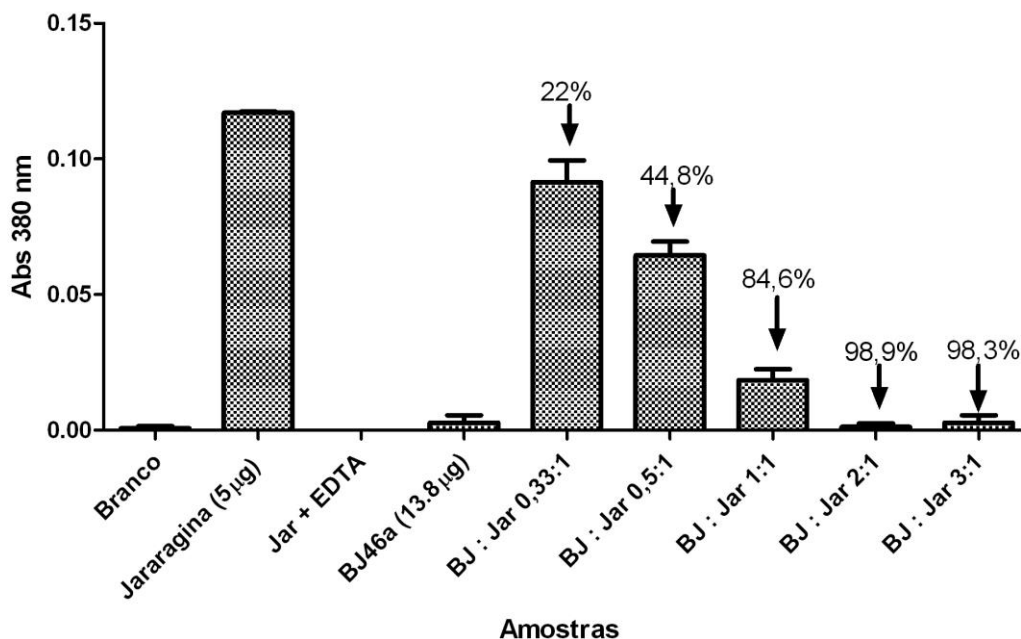


Figura 14: Ensaio de inibição da atividade azocaseínolítica de jararagina por BJ46a. As porcentagens de inibição foram calculadas relativas ao controle de atividade (jararagina 5µg).

4.3 – Caracterização estrutural da N-glicosilação de BJ46a

4.3.1- Identificação dos sítios de N-glicosilação de BJ46a por espectrometria de massas

Uma das principais abordagens para identificação de sítios de N-glicosilação por espectrometria de massas baseia-se na desglicosilação enzimática de glicopeptídeos. Para isso, a peptidil-N-glicosidase F (PNGase F; E.C. 3.5.1.52) é a enzima mais utilizada, devido a sua habilidade em clivar a ligação entre o resíduo de asparagina e o primeiro carboidrato presente no núcleo da N-glicosilação, a N-acetilglicosamina (GlcNAc). Desta maneira, a PNGase F consegue remover todas as N-glicosilações presentes na proteína, independente de sua classe: rica em manose, híbrida ou complexa, com exceção de cadeias glicídicas com fucose ligada

na posição $\alpha(1\rightarrow3)$ da primeira molécula de GlcNAc, estrutura comumente encontrada em glicoproteínas de plantas (Tretter *et al.* 1991). A remoção dos glicídeos ligados à cadeia lateral de asparagina pela ação da PNGase F promove a desamidação deste resíduo a ácido aspártico, induzindo um acréscimo de massa de 0,984 Da à massa do peptídeo. Através deste incremento de massa, é possível assinalar os sítios N-glicosilados de uma proteína ao compararmos o mapa peptídico da amostra desglicosilada por PNGase F com o da amostra sem sofrer tratamento prévio pela enzima (Pasing *et al.* 2012). Além disso, a geração de um resíduo de ácido aspártico em uma sequência consenso de glicosilação pela PNGase F cria um novo sítio de clivagem para a enzima ácido aspártico aminopeptidase (Asp-N; E.C. 3.24.33), proteinase que cliva especificamente a ligação peptídica na extremidade N-terminal de resíduos de ácido aspártico.

Entretanto, o processo de desamidação de asparagina pode ocorrer de maneira espontânea durante a manipulação da amostra, independente da ação da PNGase F. Algumas variáveis, como o tipo de tampão, pH e temperatura já foram descritas como fatores que podem ter influência significativa na reação de desamidação de asparagina à ácido aspártico (Pace *et al.* 2013). A desamidação não-enzimática de resíduos de asparagina ocorre pela formação de uma estrutura cíclica intermediária que sofre hidrólise, gerando resíduos de ácido aspártico e de ácido isoaspártico (iso-Asp) na proporção de 1:3; ligações peptídicas contendo resíduos de iso-Asp não são clivadas pela endoproteinase Asp-N (Geiger e Clarke 1987; Kameoka *et al.* 2003).

Tendo isso em vista, os sítios de N-glicosilação de BJ46a podem ser assinalados tanto por *spectral counting* de espectros MS/MS de peptídeos com desamidação de asparagina em sequências consenso de glicosilação (NXS / NXT / NXC, onde $X \neq \text{Pro}$) bem como através do sequenciamento de peptídeos resultantes da hidrólise da ligação peptídica pela enzima Asp-N contendo o novo resíduo de ácido aspártico introduzido pela ação da PNGase F.

Para identificarmos os sítios de N-glicosilação presentes em BJ46a, empregamos a metodologia ilustrada na **Figura 15**. Dois microgramas das proteínas foram submetidas à digestão tríplica *in-gel*, com redução e alquilação das bandas excisadas. O digesto tríplico resultante foi subdividido em duas alíquotas; uma alíquota foi incubada com 0,5U de PNGase F por 1h a 37°C e posteriormente incubada com Asp-N por 12h a 37°C, enquanto que a alíquota restante foi incubada apenas com Asp-N pelo mesmo período e temperatura.

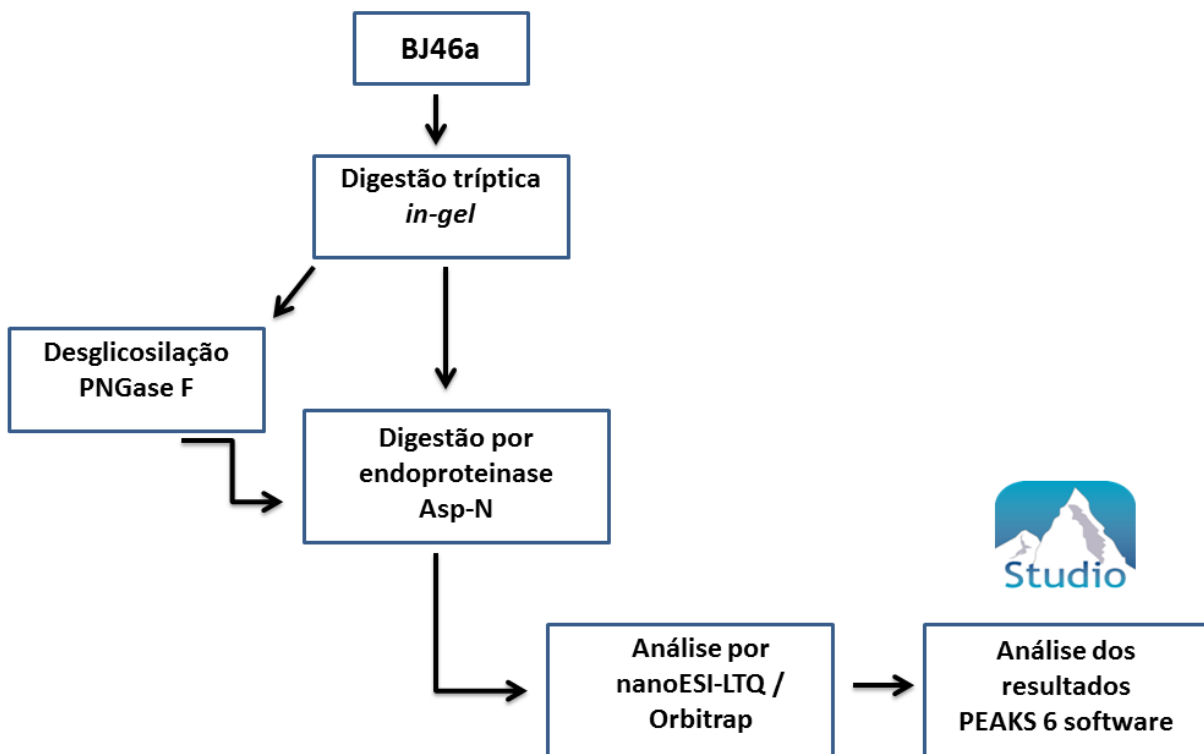


Figura 15: Fluxograma experimental para a determinação dos sítios N-glicosilados de BJ46a.

A α 1-glicoproteína ácida é uma das glicoproteínas mais bem caracterizadas do plasma humano: possui cinco sítios de N-glicosilação do tipo complexo; nesta proteína, os glicanos respondem por cerca de 45% de sua massa. Portanto, esta proteína foi escolhida como o controle positivo dos experimentos. A **Tabela 3** demonstra a quantificação de desamidações em cada asparagina presente na estrutura primária da α 1-glicoproteína ácida humana, além da predição dos sítios de N-glicosilação pela ferramenta de bioinformática Net-N-Glyc (disponível no site www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc). Esta ferramenta identifica a presença de sequências consenso de N-glicosilação em estruturas primárias e utiliza redes neurais para analisar a possibilidade de glicosilação em cada *sequon* identificado na proteína. Para α 1-glicoproteína, dos cinco sítios putativos de N-glicosilação, todos foram apontados como ocupados. Analisando a quantificação de desamidações em

asparagina em α -1 glicoproteína por *spectral counting*, detectamos desamidações em Asp135 e Asp139, para as amostras tratadas apenas com tripsina e Asp-N. Para a amostra tratada com tripsina, PNGase F e Asp-N, encontramos desamidações em Asp25, Asp34, Asp73, Asp93, Asp98, Asp135 e Asp139, sendo que as duas últimas asparaginas desamidadas também foram detectadas na amostra tratada apenas com tripsina e Asp-N. Com exceção de Asp25, Asp98, Asp135 e Asp 139, todas as asparaginas desamidadas encontradas nesta amostra estão dentro de uma sequência consenso de N-glicosilação. Portanto, dos cinco sítios putativos de N-glicosilação, nossa abordagem experimental foi capaz de identificar dois destes (a identificação do sítio Asn 73 foi considerada duvidosa, devido a baixa quantificação de desamidações neste sítio na amostra tratada por PNGase F).

A albumina de soro bovino foi escolhida como o controle negativo, por não possuir N-glicosilações em sua estrutura. Ao analisarmos o perfil de desamidações em asparagina na amostra tratada e não tratada com PNGase F (**Tabela 4**), não verificamos mudanças expressivas na quantificação de desamidações entre as duas amostras. Além disso, é importante notar que estes resíduos de ácido aspártico contidos nestes peptídeos não estão dentro de uma sequência consenso de N-glicosilação, e, portanto essas desamidações ocorreram por processos químicos independentes da ação da glicoamidase PNGase F.

Tabela 3: Análise dos sítios de N-glicosilação de α -1 glicoproteína ácida humana por meio da quantificação de desamidações em asparagina por *spectral counting* e predição dos sítios pela ferramenta Net-N-Glyc 1.0 server (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc).

N	Desamidação (D) - Spectral Counts		Sequência	Net-N-Glyc 1.0 Server	
	Tryp_Asp-N	Tryp_PNGase F_Asp-N		Asn-Xaa-Ser/Thr sequon	Possibilidade de Glicosilação
25	0	3	NLV		
34	0	36	NAT	SIM	SIM +
52	0	0	NEE		
56	0	0	NKS	SIM	SIM +++
73	0	4	NKT	SIM	SIM +++
93	0	24	NTT	SIM	SIM +
98	0	6	NVQ		
103	0	0	NGT	SIM	SIM +
135	11	3	NDE		
139	1	11	NWG		

Tabela 4: Análise dos sítios de N-glicosilação de albumina de soro bovino (BSA) por meio da quantificação de deamidações em asparagina por spectral counting e predição dos sítios pela ferramenta Net-N-Glyc 1.0 server (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc).

N	Desamidação (D) - Spectral Counts		Sequência	NetNGlyc 1.0 Server	
	Tryp_Asp-N	Tryp_PNGase F_Asp-N		Asn-Xaa-Ser/Thr sequon	Predicted to be Glycosylated
68	12	11	NEL		
123	20	23	NEC		
144	13	17	NTL		
182	2	2	NKY		
185	46	39	NGV	NO SITES PREDICTED IN THIS SEQUENCE	
290	12	17	NQD		
324	0	0	NLP		
341	4	4	NYQ		
409	1	1	NLI		
414	2	0	NCD		
428	10	12	NAL		
481	2	2	NRL		
506	0	0	NRR		
573	21	25	NFV		

Com relação à BJ46a, estudos anteriores demonstraram que o inibidor possui 4 sítios putativos de N-glicosilação em Asn76, Asn185, Asn263 e Asn274, sendo que dois destes (Asn76 e Asn263) foram confirmados indiretamente pela presença de ciclos brancos pela química de Edman (Valente *et al.* 2001). As **tabelas 7 e 8** (anexo) indicam os peptídeos identificados com desamidação em asparagina nas amostras tratadas com tripsina e Asp-N e tripsina, PNGase F e Asp-N respectivamente, enquanto que a **Tabela 5** indica a quantificação de desamidação em cada asparagina localizada na sequência de BJ46a por *spectral counting*. Na amostra tratada apenas com tripsina e Asp-N, não identificamos peptídeos com desamidação em asparagina em sequências consenso de glicosilação; as maiores taxas de desamidação foram registradas para os resíduos Asn84, Asn119 e Asn201, que não pertencem a nenhum sítio de N-glicosilação (**Figura 16, Tabela 5**)

Ao tratarmos o digesto tríptico de BJ46a com PNGase F e Asp-N, identificamos 55 peptídeos com desamidações em asparagina que não foram detectados na amostra digerida apenas com tripsina e Asp-N (**Tabela 7**, anexo). Ao analisarmos a quantificação destas desamidações, a maior parte destas modificações ocorreram nos resíduos de Asn76, Asn84, Asn185, Asn263, Asn264 e Asn268 (**Tabela 5**). Os resíduos de Asn76, Asn185 e Asn263 fazem parte de uma sequência consenso de N-glicosilação e, portanto, a conversão destes a ácido aspártico pode ser resultado da ação da PNGase F, indicando a provável glicosilação destas asparaginas. Verificamos também uma desamidação expressiva no resíduo Asn264, contíguo ao resíduo Asn263, que faz parte de uma sequência consenso de N-glicosilação (**Figura 17**).

É interessante notar que para Asn268 foram sequenciados 34 peptídeos com desamidação neste resíduo, exclusivamente na amostra que foi desglicosilada por PNGase F. Na estrutura primária de BJ46a, a este resíduo seguem-se resíduos de fenilalanina, valina e histidina (NFVH) (**Figura 17**). Alguns estudos já apontam o motivo N-X-V (onde X representa qualquer resíduo com exceção de prolina) como um sítio não-canônico de N-glicosilação (Zielinska *et al.* 2010). Entretanto, Palmisano e colaboradores também identificaram desamidações expressivas neste mesmo motivo em amostras de *Escherichia coli* submetidas à digestão tríptica e desglicosilação por PNGase F. Como *E. coli* não apresenta a maquinaria enzimática para a N-glicosilação de proteínas, a identificação do motivo N-X-V

nestras amostras indica que a desamidação deste resíduo de asparagina pode ter ocorrido independentemente da ação da PNGase F (Palmisano *et al.* 2012).

Apesar do processo de reconhecimento do sítio de N-glicosilação pelo complexo enzimático da oligossacariltransferase não estar completamente elucidado, trabalhos na literatura indicam a importância do grupamento hidroxila localizado nas cadeias laterais de serina e treonina durante a glicosilação da cadeia lateral do resíduo de asparagina. Bause e Legler sintetizaram pequenos peptídeos de sequência Tyr-Asn-Gly-X-Ser-Val, substituíram X pelos resíduos de treonina, cisteína, valina e O-metiltreonina e analisaram a cinética da glicosilação de cada peptídeo pela OST. Destes, apenas os peptídeos contendo treonina, cisteína e serina na posição X serviram de aceptores para a OST; não foi possível detectar a atividade da transferase com os peptídeos contendo valina ou O-metiltreonina na posição X (Bause e Legler 1981). Portanto, com os dados disponíveis na literatura, ainda não é possível afirmar se as desamidações verificadas na sequência NFV contida na amostra de BJ46a tratada com tripsina, PNGase F e Asp-N realmente indicam um sítio adicional de N-glicosilação nesta proteína.

Com relação ao último sítio putativo de N-glicosilação em BJ46a, localizado em Asn274, quantificamos 10 espectros com desamidação neste resíduo apenas nas amostras desglicosiladas por PNGase F. É possível que este último sítio também esteja ocupado por cadeias oligossacarídicas, mas, dos quatro sítios putativos de N-glicosilação de BJ46a, este foi o que teve a menor quantificação de desamidações em asparagina na amostra tratada por PNGase F.

Para minimizar a questão de desamidações artefatuais de asparagina, algumas modificações da técnica já foram propostas na literatura. A digestão por PNGase F pode ser conduzida em meio aquoso contendo o isótopo ^{18}O . Na presença deste isótopo, a diferença de massa observada para a desamidação de asparagina pela ação da glicoamidase sofrerá um acréscimo de 2 Da, passando de 0.98 para 2.98 Da. Além disso, será possível diferenciar entre a desamidação promovida pela PNGase F da desamidação espontânea, ocorrida durante a preparação da amostra (Li *et al.* 2008). Além disso, Hao e colaboradores demonstraram que, realizando a digestão triptica em pH 6 e a desglicosilação pela PNGase F em pH 5, há a diminuição da desamidação artefactual de asparagina, e mantendo a eficiência de digestão por estas enzimas (Hao *et al.* 2011).

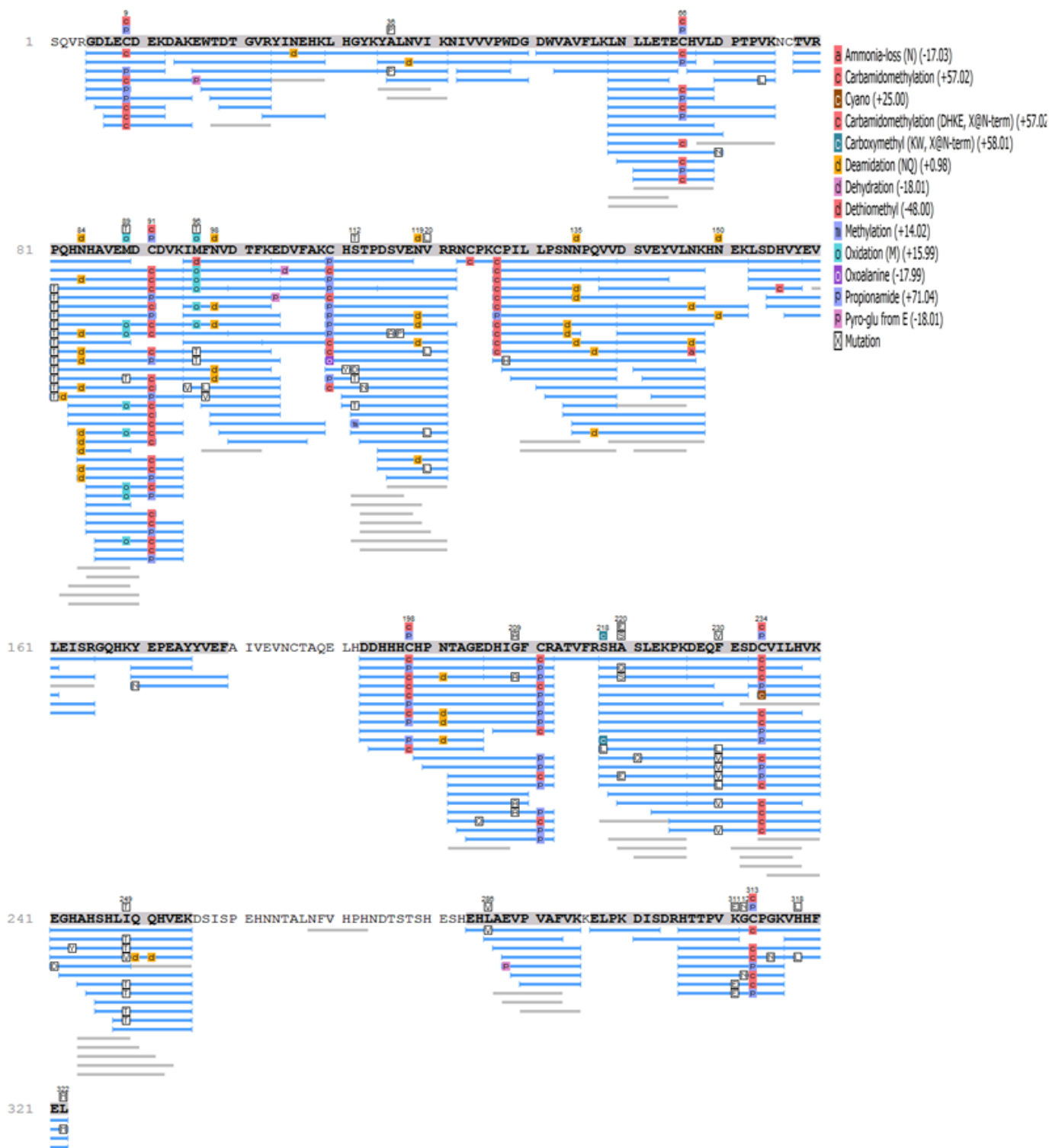


Figura 16: Cobertura de sequência para BJ46a digerida com tripsina e endoproteínase Asp-N.

As barras em azul indicam os peptídeos identificados para cada região da proteína; as barras em cinza indicam peptídeos identificados apenas pelo sequenciamento *de novo*, com FDR abaixo de 1%

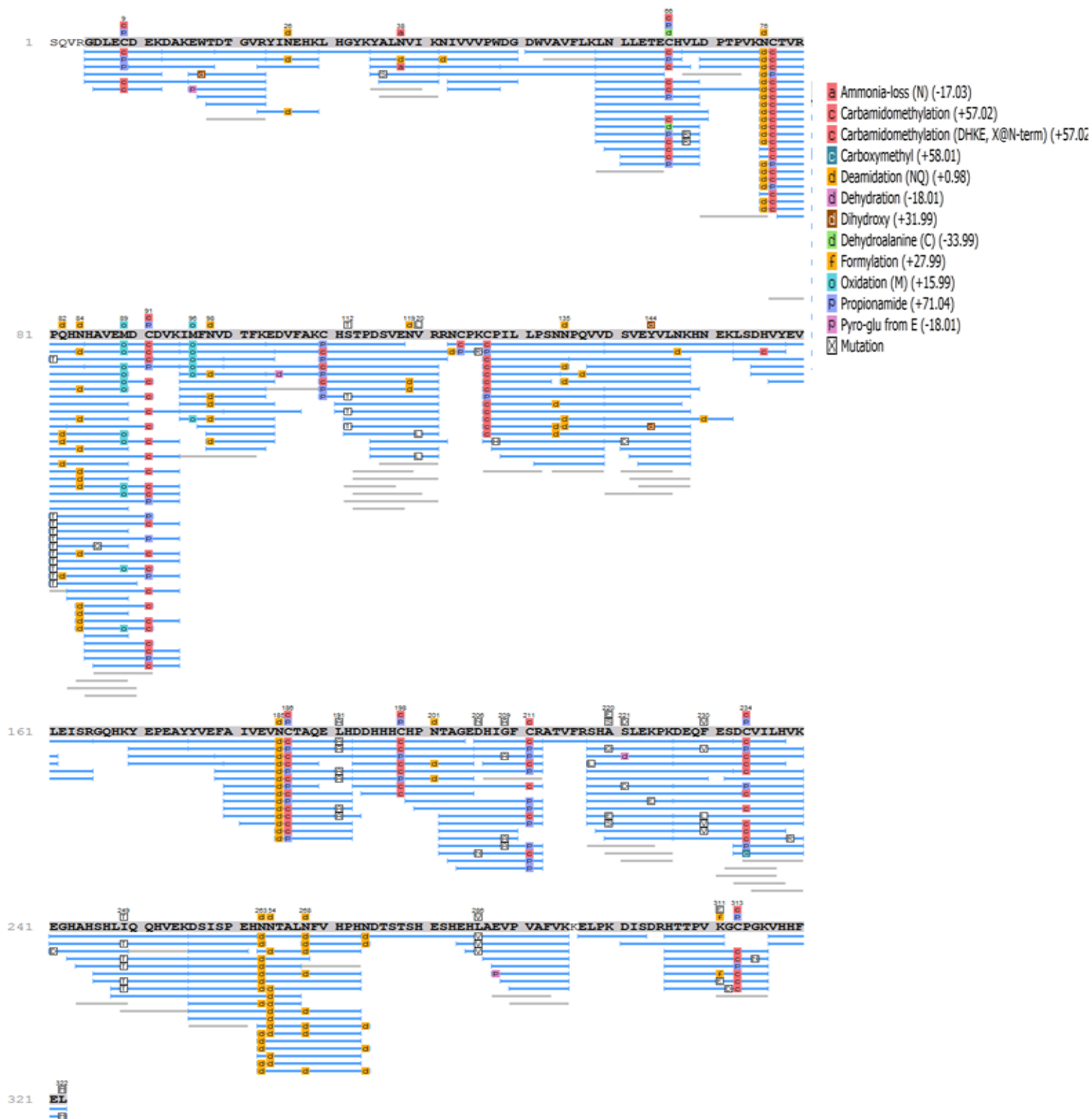


Figura 17: Cobertura de sequência para BJ46a digerida com tripsina, desglicosilada por PNGase F e digerida com endoproteínase Asp-N.

As barras em azul indicam os peptídeos identificados para cada região da proteína; as barras em cinza indicam peptídeos identificados apenas pelo sequenciamento *de novo*, com FDR abaixo de 1%

Tabela 5: Análise dos sítios de N-glicosilação de BJ46a por meio da quantificação de desamidações em asparagina por *spectral counting* e predição dos sítios pela ferramenta Net-N-Glyc 1.0 Server (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc).

N	Desamidação (D) - Spectral Counts		Sequência	NetNGlyc 1.0 Server	
	Tryp_Asp N	Tryp_PNGase F_Asp N		Asn-Xaa-Ser/Thr sequon	Predicted to be Glycosylated
26	13	18	NEH		
38	10	10	NVI		
42	0	5	NIV		
60	0	0	NLL		
76	0	93	NCT	SIM	SIM ++
84	25	50	NHA		
98	8	16	NVD		
119	27	9	NVR		
123	0	0	NCP		
134	7	8	NNP		
135	10	12	NPQ		
147	7	8	NKH		
150	2	1	NEK		
185	0	31	NCT	SIM	SIM +
201	16	10	NTA		
263	0	72	NNT	SIM	SIM -
264	0	36	NTA		
268	0	34	NFV		
274	0	10	NDT	SIM	SIM +

Tabela 6: Peptídeos com desamidação em asparagina identificados na amostra de BJ46a tratada com tripsina e Asp-N.

Peptídeos que apresentam desamidação em sequência consenso de N-glicosilação estão marcados em negrito. Modificações encontradas nos peptídeos: (+.98) – desamidação; (+57,02) – carbamidometilação; (+15,99) – oxidação; (+71,04) – propionamidação; sub: substituição pontual de resíduos.

Peptídeo #	Nº resíduo início-final	Sequência	# Espectros	-10 log P (PEAKS)	m/z	Massa experimental
1	24-28	YIN(+.98)EHK	12	48,91	402,6974	803,3813
2	35-41	YALN(+.98)VIK	10	53,18	411,241	820,4694
3	78-94	TVRPQHN(+.98)HAVEMDC(+57.02)DVK	2	37,07	679,6465	2035,9204
4	81-94	T(sub P)QHN(+.98)HAVEMDC(+71.04)DVK	1	50,34	566,9097	1697,7137
5	81-94	T(sub P)QHN(+.98)HAVEMDC(+57.02)DVK	2	36,63	562,2382	1683,6981
6	81-91	T(sub P)QHN(+.98)HAVEMDC(+57.02)	1	39,85	671,7603	1341,5078
7	81-94	T(subP)QHN(+.98)HAVEM(+15.99)DC(+57.02)DVK	1	43,42	850,8521	1699,693
8	135-148	N(+.98)PQVVDSVEYVLNK	8	88,39	802,9108	1603,8093
9	84-94	N(+.98)HAVEMDC(+71.04)DVK	3	65,38	666,7803	1331,5486
10	84-94	N(+.98)HAVEMDC(+57.02)DVK	8	70,93	659,7728	1317,533
11	84-91	N(+.98)HAVEMDC(+57.02)	4	35,19	488,6776	975,3427
12	84-94	N(+.98)HAVEM(+15.99)DC(+57.02)DVK	4	56,96	667,7699	1333,5278
13	84-89	N(+.98)HAVEM	4	26,69	351,149	700,285
14	84-89	N(+.98)HAVEM	4	26,69	351,149	700,285
15	95-104	IMFN(+.98)VDTFKE	2	67,48	622,7963	1243,5795
16	95-104	IM(+15.99)FN(+.98)VDTFKE	1	56,47	630,793	1259,5743
17	95-103	IM(+15.99)FN(+.98)VDTFK	2	45,22	566,2717	1130,5317
18	140-152	DSVEYVLNKHN(+.98)EK	2	38,1	525,9254	1574,7576
19	140-152	DSVEYVLN(+.98)KHNEK	6	62,73	788,3846	1574,7576
20	140-148	DSVEYVLN(+.98)K	1	29,74	1067,5273	1066,5182
21	115-121	DSVEN(+.98)VR	1	31,91	410,195	818,377
22	193-212	DDHHHC(+71.04)HPN(+.98)TAGEDHIGFC(+71.04)R	3	28,9	611,0004	2439,9822

Tabela 6: Peptídeos com desamidação em asparagina identificados na amostra de BJ46a tratada com tripsina e Asp-N (continuação)

Peptídeo #	Nº resíduo início-final	Sequência	# Espectros	-10 log P (PEAKS)	m/z	Massa experimental
23	193-205	DDHHHC(+71.04)HPN(.98)TAGE	1	35	514,5314	1540,575
24	110-122	C(+71.04)HSTPDSVEN(+.98)VRR	10	33,47	393,6852	1570,7158
25	127-139	C(+57.02)PILLPSNN(+.98)PQVV	1	44,91	726,3796	1450,749
26	127-135	C(+57.02)PILLPSNN(+.98)	1	34,72	1028,5092	1027,5009
27	127-135	C(+57.02)PILLPSN(+.98)N	1	36,43	1028,5088	1027,5009
28	110-121	C(+57.02)HSTPDSVEN(+.98)VR	5	46,56	467,8725	1400,599
29	95-103	IMFN(+.98)VDTFK	3	57,17	558,2744	1114,5369
30	193-212	DDHHHC(+57.02)HPN(+.98)TAGEDHIGFC(+71.04)R	7	55,99	809,6608	2425,9666
31	110-121	C(+71.04)HSTPDSVEN(+.98)VR	11	53,76	708,313	1414,6146
32	193-205	DDHHHC(+57.02)HPN(+.98)TAGE	5	49,27	764,285	1526,5593
33	127-139	C(+57.02)PILLPSN(+.98)NPQVV	6	46,66	726,3807	1450,749
34	110-121	K.C(+57.02)HSTPDSVEN(+.98)VR.R	5	46,56	467,8725	1400,599

Tabela 7: Peptídeos com desamidação em asparagina identificados na amostra de BJ46a tratada com tripsina, PNGase F e Asp-N.

Peptídeos que apresentam desamidação em sequência consenso de N-glicosilação estão marcados em negrito. Modificações encontradas nos peptídeos: (+.98) – desamidação; (+57,02) – carbamidometilação; (+15,99) – oxidação; (+71,04) – propionamidação; sub: substituição pontual de resíduos.

Peptídeo #	Nº resíduo início-final	Sequência	# Espectros	-10 log P (PEAKS)	m/z	Massa experimental
1	263-274	N(+.98)NTALN(+.98)FVHPHN(+.98)	3	64.55	690.8116	1379.6106
2	263-274	NN(+.98)TALN(+.98)FVHPHN(+.98)	1	56.18	690.8129	1379.6106
3	263-273	N(+.98)N(+.98)TALN(+.98)FVHPH	8	41.05	633.7905	1265.5676
4	263-274	N(+.98)NTALNFVHPHN(+.98)	4	75.73	690.3198	1378.6266
5	256-273	DSISPEHNN(+.98)TALN(+.98)FVHPH	2	68.81	677.6443	2029.913
6	256-273	DSISPEHN(+.98)NTALN(+.98)FVHPH	6	65.21	677.6428	2029.913
7	256-273	DSISPEHN(+.98)N(+.98)TALNFVHPH	5	60.07	677.6426	2029.913
8	76-94	N(+.98)C(+57.02)TVRPQHN(+.98)HAVEMDC(+57.02)DVK	5	58.77	771.3325	2310.978
9	263-273	N(+.98)NTALN(+.98)FVHPH.N	9	50.56	633.2982	1264.5836
10	76-89	N(+.98)C(+57.02)TVRPQHN(+.98)HAVEM	8	48.25	847.8716	1693.7301
11	263-273	NN(+.98)TALN(+.98)FVHPH	3	47.57	633.298	1264.5836
12	263-273	N(+.98)N(+.98)TALNFVHPH	7	47.13	633.2979	1264.5836
13	76-89	N(+.98)C(+57.02)TVRPQ(+.98)HNHAVEM	3	46.39	847.8712	1693.7301
14	76-89	N(+.98)C(+71.04)TVRPQHN(+.98)HAVEM	4	45.67	570.2545	1707.7457
15	76-89	N(+.98)C(+57.02)TVRPQHN(+.98)HAVEM(+15.99)	4	42.16	570.9141	1709.725
16	256-267	DSISPEHN(+.98)N(+.98)TAL	3	35.94	650.2877	1298.5626
17	268-274	L.N(+.98)FVHPHN(+.98).D	2	35.46	433.6926	865.3718
18	76-89	N(+.98)C(+57.02)TVRPQ(+.98)HNHAVEM(+15.99)	1	31.53	570.914	1709.725
19	127-139	C(+57.02)PILLPSN(+.98)N(+.98)PQVV	2	30	726.8724	1451.733
20	180-192	AIVEVN(+.98)C(+71.04)TAQELH	4	86.28	749.8622	1497.7134
21	135-148	N(+.98)PQVVDSVEYVLNK	4	86.01	802.9109	1603.8093
22	180-192	AIVEVN(+.98)C(+57.02)TAQELH	6	81.31	742.8558	1483.6976
23	95-104	IMFN(+.98)VDTFKE	3	78.72	622.7964	1243.5795

Tabela 7: Peptídeos com desamidação em asparagina identificados na amostra de BJ46a tratada com tripsina, PNGase F e Asp-N (continuação).

Peptídeo #	Nº resíduo início-final	Sequência	# Espectros	-10 log P (PEAKS)	m/z	Massa experimental
24	256-273	DSISPEHN(+.98)NTALNFVHPH	7	76.11	677.3155	2028.929
25	256-273	VDSVEYVLN(+.98)KHNEK	8	73.78	788.3849	1574.7576
26	84-94	N(+.98)HAVEMDC(+57.02)DVK	8	72.56	659.773	1317.533
27	179-192	FAIVEVN(+.98)C(+57.02)TAQELH	3	70.73	816.3897	1630.7661
28	84-94	N(+.98)HAVEM(+15.99)DC(+57.02)DVK	4	66.79	667.7708	1333.5278
29	256-273	DSISPEHNN(+.98)TALNFVHPH	1	65.71	677.3157	2028.929
30	76-94	N(+.98)C(+57.02)TVRPQHNAVEMDC(+57.02)DVK	4	64.56	771.0043	2309.9939
31	95-104	IM(+15.99)FN(+.98)VDTFKE	4	63.62	630.7937	1259.5743
32	95-103	IMFN(+.98)VDTFK	2	58.28	558.2746	1114.5369
33	193-205	DDHHHC(+57.02)HPN(+.98)TAGE	8	57.64	764.2838	1526.5593
34	81-94	T(sub P)QHN(+.98)HAVEMDC(+57.02)DVK	2	57.52	842.8541	1683.6981
35	76-91	N(+.98)C(+57.02)TVRPQHNAVEM(+15.99)DC(+57.02)	5	57.5	662.2723	1983.7986
36	263-273	N(+.98)NTALNFVHPH	8	55.76	632.8056	1263.5996
37	24-29	YIN(+.98)EHK	14	54.88	402.6971	803.3813
38	176-192	YVEFAIVEVN(+.98)C(+57.02)TAQEA(sub L)H	3	54.6	990.9535	1979.8934
39	127-139	C(+57.02)PILLPSN(+.98)NPQVV	5	53.87	726.3795	1450.749
40	35-41	YALN(+.98)VIK	10	52.8	411.2414	820.4694
41	176-192	YVEFAIVEVN(+.98)C(+71.04)TAQEA(sub L)H	2	52.62	997.9612	1993.9091
42	76-89	N(+.98)C(+57.02)TVRPQHNAVEM	14	51.75	847.3795	1692.7461
43	274-295	N(+.98)DTSTSHESHEHV(sub L)A EVPVAFVK	1	51.47	807.7149	2420.1243
44	76-94	N(+.98)C(+57.02)TVRPQHNAVEM(+15.99)DC(+57.02)DVK	3	50.96	776.3365	2325.9888
45	76-91	N(+.98)C(+57.02)TVRPQHNAVEMDC(+57.02)	6	50.82	656.9406	1967.8037
46	180-189	AIVEVN(+.98)C(+57.02)TAQ	6	50.8	553.2624	1104.5121
47	76-94	N(+.98)C(+71.04)TVRPQHNAVEMDC(+57.02)DVK	2	49.02	582.0084	2324.0095
48	76-84	N(+.98)C(+57.02)TVRPQHN	8	47.99	563.7554	1125.4985

Tabela 7: Peptídeos com desamidação em asparagina identificados na amostra de BJ46a tratada com tripsina, PNGase F e Asp-N (continuação).

Peptídeo #	Nº resíduo início-final	Sequência	# Espectros	-10 log P (PEAKS)	m/z	Massa experimental
49	95-103	IM(+15.99)FN(+.98)VDTFK	3	47.97	566.2725	1130.5317
50	127-139	C(+57.02)PILLPSNN(+.98)PQVV	4	47.94	726.3806	1450.749
51	180-193	AIVEVN(+.98)C(+57.02)TAQEA(sub L)HD	2	47.63	779.3453	1556.6776
52	181-192	IVEVN(+.98)C(+57.02)TAQELH	1	47.56	707.3369	1412.6605
53	110-121	C(+57.02)HSTPDSVEN(+.98)VR	4	47.4	467.873	1400.599
54	76-83	N(+.98)C(+57.02)TVRPQH	4	47.2	506.7338	1011.4556
55	76-84	N(+.98)C(+71.04)TVRPQHN	5	46.82	570.7631	1139.5142
56	263-273	NN(+.98)TALNFVHPH	3	46.07	632.8053	1263.5996
57	180-189	AIVEVN(+.98)C(+71.04)TAQ	4	45.41	560.2702	1118.5277
58	256-268	DSISPEHN(+.98)NTALN	4	44.96	706.8161	1411.6216
59	180-192	AIVEVN(+.98)C(+57.02)TAQEA(sub L)H	1	42.91	721.8317	1441.6508
60	256-297	DSISPEHNN(+.98)TAL	3	42.13	649.796	1297.5786
61	76-89	N(+.98)C(+57.02)TVRPQHNHAVEM(+15.99)	7	41.78	570.5867	1708.741
62	179-182	FAIVEVN(+.98)C(+71.04)TAQEA(sub L)H	1	41.17	802.374	1602.7347
63	110-121	C(+71.04)HSTPDSVEN(+.98)VR	5	40.24	708.3135	1414.6146
64	127-148	C(+57.02)PILLPSN(+.98)NPQVVDSVEYVLNK	1	40.04	833.7645	2498.2727
65	185-192	N(+.98)C(+57.02)TAQELH	4	39.99	487.2044	972.3971
66	179-192	FAIVEVN(+.98)C(+57.02)TAQEA(sub L)H	1	39.18	795.3662	1588.7191
67	42-50	N(+.98)IVVVPWDG	5	38.55	999.5157	998.5073
68	123-139	N(+.98)C(+71.04)PR(sub K)C(+71.04)PILLPSNNPQVV	1	38.33	1004.0112	2006.0077

4.3.2 - Análise do tipo de N-glicosilação de BJ46a utilizando a enzima endoglicosidase H

A enzima endoglicosidase H (Endo H; E.C. 3.2.1.96) é uma endoglicosidase que catalisa a hidrólise da ligação $\beta 1 \rightarrow 4$ entre os dois primeiros resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) presentes no núcleo de glicosilações N-ligadas ricas em manose e híbridas, deixando uma única molécula de GlcNAc ligada à cadeia lateral de asparagina. Endo H requer uma estrutura glicídica específica, Man $\alpha 1 \rightarrow 3$ Man $\alpha 1 \rightarrow 6$ Man $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc para clivagem; a ausência ou substituição do resíduo Man $\alpha 1 \rightarrow 3$ no terminal redutor do oligossacarídeo bloqueia completamente a ação da endoglicosidase H (**Figura 18**). Glicídeos N-ligados do tipo complexo não possuem resíduos de manose ligados nesta posição e, por isso, são resistentes à ação desta enzima (Kobata e Takasaki 1993; O'Neill 1996). Devido a esta especificidade, os ensaios de desglicosilação com Endo H podem fornecer informações importantes quanto à natureza das N-glicosilações presentes em BJ46a.

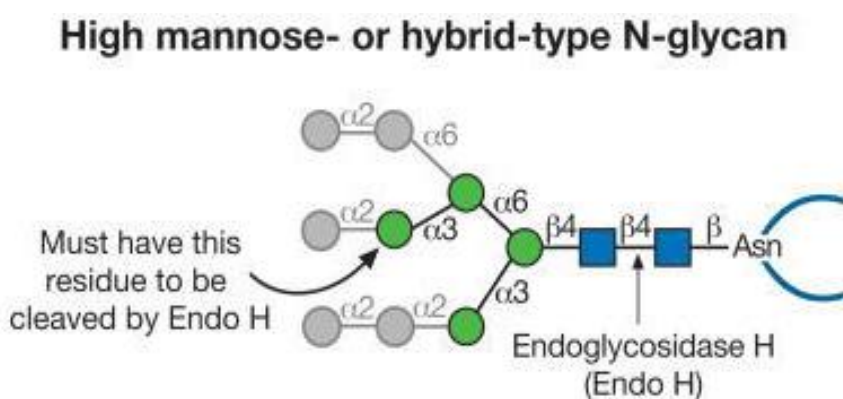


Figura 18: Representação esquemática do substrato mínimo para a ação da Endoglicosidase H.

Reproduzido de Mulloy *et al.* (2009).

Para este ensaio, utilizamos como controles positivo e negativo as proteínas ovalbumina e albumina de soro bovino, respectivamente. A ovalbumina é uma glicoproteína amplamente estudada na literatura e sua parte glicídica é bem caracterizada. Esta proteína possui um único sítio de N-glicosilação em Asn 392. Há intensa microheterogeneidade dos glicídeos ligados a este resíduo de asparagina, mas todos foram reportados como sendo dos tipos rico-em-manose ou híbridos (Harvey *et al.* 2010). Já a albumina de soro bovino (BSA) não possui nenhuma sequência consenso de N-glicosilação em sua estrutura primária e, por isso, foi escolhida como controle negativo dos ensaios de desglicosilação enzimática de BJ46a.

Ovalbumina, BSA e BJ46a foram incubadas com duas diferentes proporções de enzima / substrato (12,5 U ou 500U de enzima / μ g de glicoproteína) por 1h a 37°C. Após este período, o conteúdo destas reações foi analisado por SDS-PAGE a 12% em condições redutoras, como demonstrado na **Figura 19**. Ao analisarmos as proteínas controle, ovalbumina e BSA, verificamos um aumento na mobilidade eletroforética de ovalbumina tratada com 12,5 e 500 U de Endo H (raias 2 e 3) em comparação com a amostra controle (raia 1). A massa molecular relativa de ovalbumina incubada com 500U de enzima, em função da migração das proteínas contidas no padrão de massa molecular, foi calculada em aproximadamente 41 kDa, indicando a presença de várias estruturas glicídicas sensíveis a ação da endoglicosidase H nesta proteína. Já para a albumina de soro bovino, a massa calculada foi de aproximadamente 68kDa. Em ambas as proporções de endoglicosidase H testadas, não verificamos mudanças significativas na mobilidade eletroforética desta proteína e sua massa molecular manteve-se constante, resultado esperado para uma proteína que não possui cadeias glicídicas em sua estrutura.

Para BJ46a, não foi possível verificar mudanças na mobilidade eletroforética de BJ46a tratada com 12,5 ou 500U de Endo H (raias 8 e 9) em comparação com o controle (raia 7) . Este resultado sugere que os glicídeos presentes nesta proteína se mostraram resistentes à hidrólise pela endoglicosidase H e que, portanto, podem ser do tipo complexo. O mesmo resultado foi verificado para DM43, inibidor de metaloproteinases da superfamília gênica da imunoglobulina, que apresenta N-glicosilações do tipo complexo em sua estrutura (León *et al.* 2012).

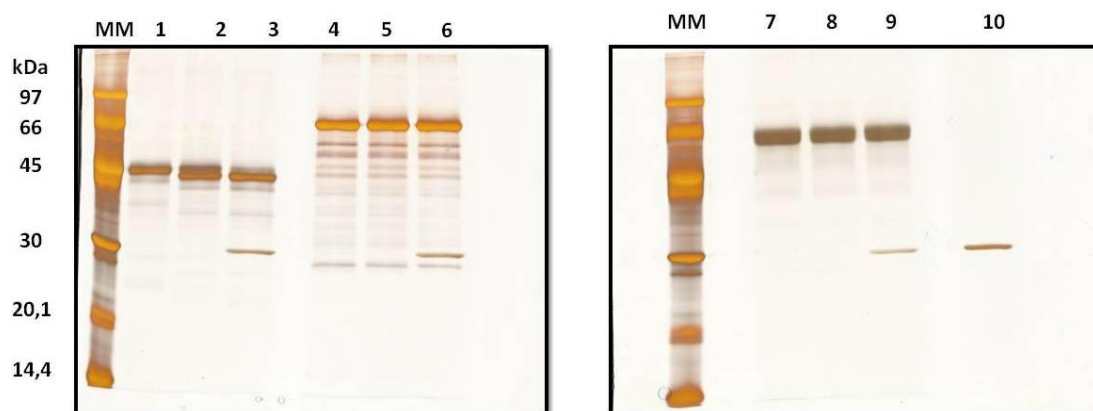


Figura 19: Ensaio de desglicosilação por endoglicosidase H das proteínas ovalbumina, BSA e BJ46a.

Raia 1: Ovalbumina controle (1 μ g); 2: Ovalbumina tratada com 12,5 U de Endo H; 3: Ovalbumina tratada com 500U de Endo H; 4: BSA controle (1 μ g); 5: BSA tratada com 12,5U de Endo H; 6: BSA tratada com 500U de Endo H; 7: BJ46a controle (1 μ g); 8: BJ46a tratada com 12,5U de Endo H; 9: BJ46a tratada com 500U de EndoH; 10: Endo H controle; MM: marcador de massa molecular. Corado por impregnação por prata.

4.3.3 – Análise da composição / estrutura das antenas oligossacarídicas de BJ46a através de hidrólises sucessivas com exoglicosidases monitorada por espectrometria de massas

Uma das principais abordagens para a análise dos monossacarídeos que compõem a parte glicídica de uma proteína baseia-se no uso de exoglicosidases. As exoglicosidases são enzimas que clivam monossacarídeos posicionados no terminal redutor da N-glicosilação e possuem estrita especificidade quanto à natureza do monossacarídeo clivado, sua configuração anomérica e sua respectiva ligação glicosídica na cadeia (Kobata e Takasaki 1993; Medzihradzsky 2005; Morelle e Michalski 2005). Dessa forma, as exoglicosidases fornecem informações importantes para a elucidação da natureza dos açúcares presentes na N-glicosilação de BJ46a, o tipo de ligação envolvida e sua contribuição para a massa do inibidor.

Iniciamos nossa análise pela enzima neuraminidase (E.C. 3.2.1.18), exoglicosidase capaz de clivar resíduos de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico)

no terminal redutor da N-glicosilação, se ligado nas posições $\alpha 2 \rightarrow 3$, $\alpha 2 \rightarrow 6$, $\alpha 2 \rightarrow 8$ e $\alpha 2 \rightarrow 9$. Incubamos BJ46a com neuraminidase por 1h a 37°C; alíquotas correspondentes ao inibidor desialilado e à BJ46a nativa foram analisadas por MALDI/TOF no modo linear, como demonstra a **Figura 20**.

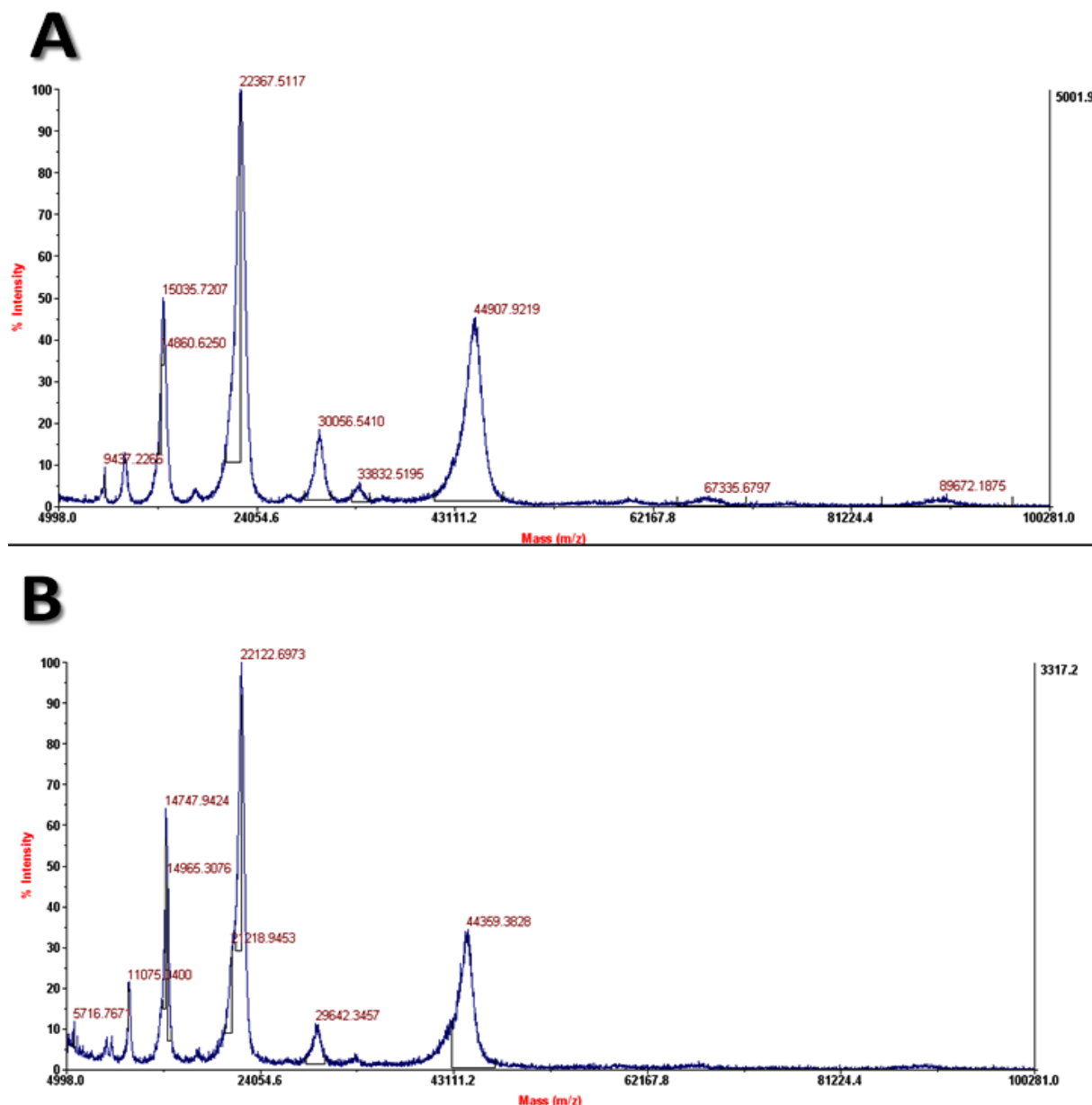


Figura 20: Análise por MALDI/TOF de BJ46a nativa e parcialmente desglicosilada com neuraminidase.

Incubação por 1h a 37°C, na proporção de 0,0002U de neuraminidase/ μ g glicoproteína.

Painel A: Espectro em modo linear de BJ46a nativa;

Painel B: Espectro em modo linear de BJ46a tratada com neuraminidase.

Nesta análise, a massa do monômero de BJ46a nativa foi calculada em 44907 Da; após tratamento com neuraminidase, verificamos que a massa do inibidor foi calculada em 44359Da, uma diferença de massa de 548,53 Da. Considerando-se a massa média do resíduo de ácido siálico (291,26Da), a exoglicosidase foi capaz de remover 2 moléculas de ácido siálico da parte glicídica de BJ46a. Entretanto, é importante notar que a massa registrada do monômero de BJ46a em sua forma nativa se mostrou menor do que a massa calculada em trabalho anterior, de 46101 Da (utilizando-se um espectrômetro do tipo MALDI/TOF - Voyager DE-PRO, Perseptive Biosystems) (Valente *et al.* 2001).

Durante a análise de glicoproteínas e glicopeptídeos por MALDI/TOF, os resíduos de ácido siálico podem sofrer fragmentação, devido à labilidade das ligações glicosídicas terminais. As moléculas de NeuNAc podem ser fragmentadas na fonte, no momento em que o laser incide sobre a amostra. O comprimento de onda e a frequência do laser utilizado na ionização influenciam diretamente na fragmentação destas ligações (Wada *et al.* 2007; Wheeler *et al.* 2009).

Segundo as especificações técnicas, fornecidas pela Applied Biosystems (2000), o espectrômetro Voyager DE-PRO utilizado para calcular a massa do monômero de BJ46a apresenta um laser de nitrogênio de 337nm e uma frequência de disparo de 20 Hz. Estas configurações são inferiores ao laser do espectrômetro AB SCIEX TOF/TOF 5800, de 345nm e uma frequência de 1000 Hz, utilizado neste trabalho (Holcapek *et al.* 2012). Portanto, é possível que a diferença de massa observada entre as duas medições possa ser atribuída à maior ou menor fragmentação das moléculas de ácido siálico durante a ionização. Além da influência do laser, a matriz utilizada também pode ter influência na fragmentação destas ligações – algumas matrizes classificadas como “quentes”, como o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, induzem maior fragmentação destas ligações glicosídicas (Selman *et al.* 2012) .

Estas hipóteses foram confirmadas por dados gerados em trabalho paralelo a esta dissertação. Foram gerados espectros para BJ46a utilizando uma abordagem com ionização por electrospray, acoplada a um espectrômetro de massas Q-TOF (Synapt G1, Waters, EUA). Os dados obtidos demonstraram que BJ46a em sua forma nativa, apresenta diversas formas moleculares distribuídas na faixa de 47-50kDa. Após o tratamento com neuraminidase, verificamos a presença de formas moleculares na faixa de 43 – 46 kDa, indicando uma perda média de massa de

4kDa, indicando uma clivagem de cerca de 14 moléculas de ácido siálico (informação verbal)¹.

Posteriormente, uma alíquota de BJ46a tratada com neuraminidase foi incubada com β -Galactosidase (E.C. 3.2.1.23) na proporção de 0,00015U por micrograma de glicoproteína por 6h a 37°C e analisada por MALDI/TOF no modo linear (**Figura 21**). Após o tratamento com neuraminidase e β -Galactosidase, a massa do monômero de BJ46a foi calculada em 43381Da, uma diferença de 977 Da em relação à massa calculada após tratamento com neuraminidase. Considerando-se a massa média do resíduo de galactose em 162,1Da, esta diferença corresponderia à perda de aproximadamente 6 resíduos de galactose. A enzima β -galactosidase de *S. pneumoniae* cliva preferencialmente resíduos de galactose quando ligados via $\beta(1\rightarrow4)$ ao próximo resíduo da antena oligossacarídica, a N-acetilglicosamina. Portanto, apesar da baixa resolução dos sinais do espectro, mostramos que BJ46a possui resíduos de galactose e N-acetilglicosamina unidos por ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$, resultado inédito na literatura.

Para finalizarmos nossas análises, uma alíquota de BJ46a tratada com neuraminidase e β -galactosidase foi incubada com a enzima β -N-acetilglicosaminidase (E.C. 3.2.1.52) na proporção de 0,0008U por micrograma de glicoproteína, por 24h à 37°C, e novamente analisada por MALDI/TOF (**Figura 22**). Neste espectro (painel B), foi possível verificar uma diferença de massa de 638 Da em relação à massa de BJ46a parcialmente desglicosilada com neuraminidase e β -galactosidase. Assumindo a massa média do resíduo de N-acetilglicosamina como 203,2 Da, esta diferença de massa entre estas duas espécies parcialmente desglicosiladas do inibidor corresponderia à perda de aproximadamente 3 a 4 moléculas de N-acetilglicosamina.

Nossos resultados confirmaram a presença de ácido siálico, galactose e N-acetilglicosamina nas antenas oligossacarídicas de BJ46a, resíduos frequentemente encontrados em N-glicosilações do tipo complexo. Apesar de não podermos determinar, com base nestes dados, a quantidade de cada monossacarídeo presente na parte glicídica do inibidor, as perdas de massa observadas são compatíveis com N-glicosilações mono- ou biantenárias, se considerarmos as evidências de ocupação dos quatro sítios putativos de N-glicosilação presentes na estrutura primária de BJ46a.

¹ Valente RH, 2014.

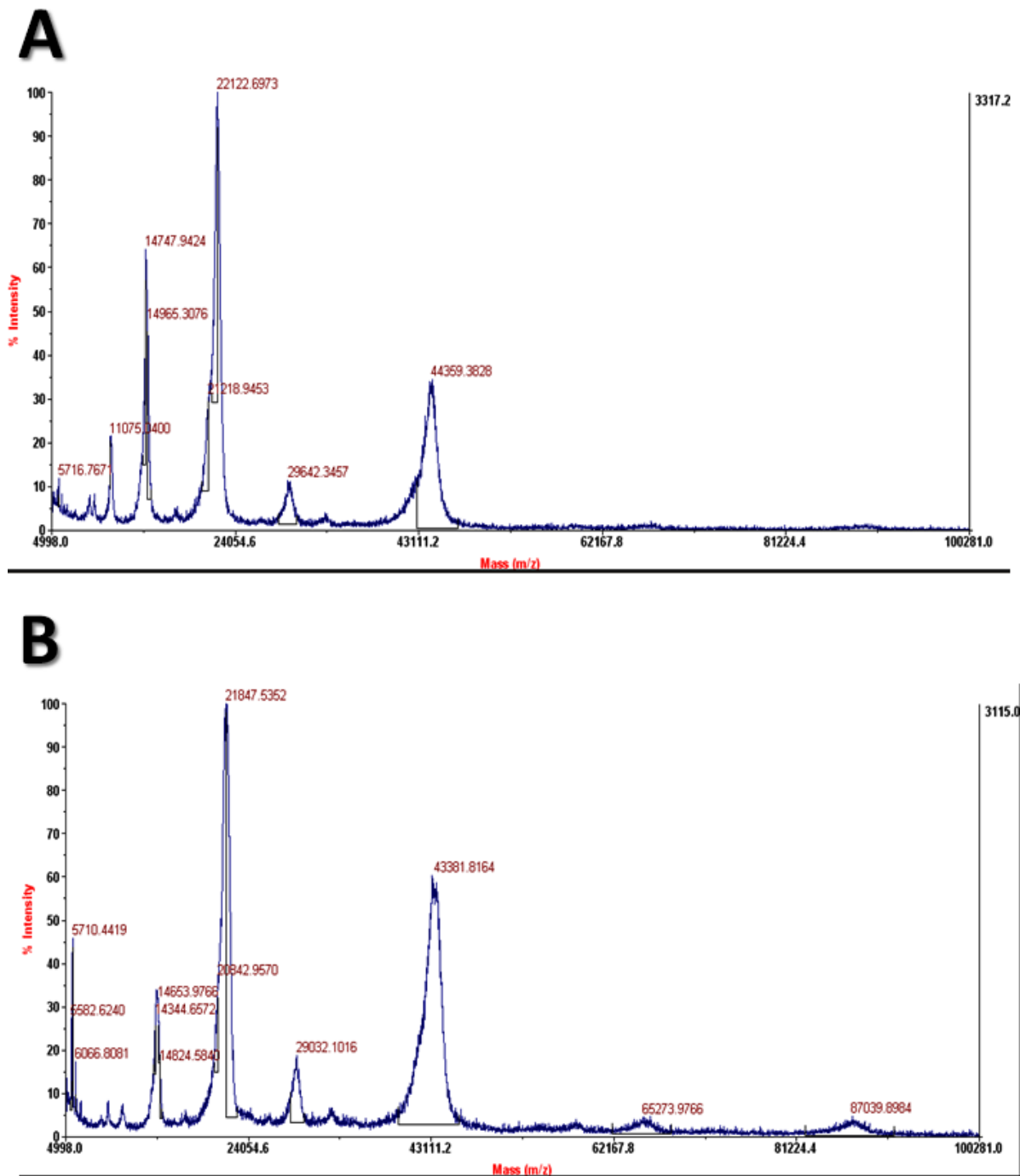


Figura 21: Análise por MALDI/TOF de BJ46a tratada com neuraminidase e parcialmente desglicosilada com neuraminidase e β -galactosidase.

Painel A: Espectro em modo linear de BJ46a tratada com neuraminidase;
 Painel B: Espectro em modo linear de BJ46a tratada com neuraminidase e β -Galactosidase.

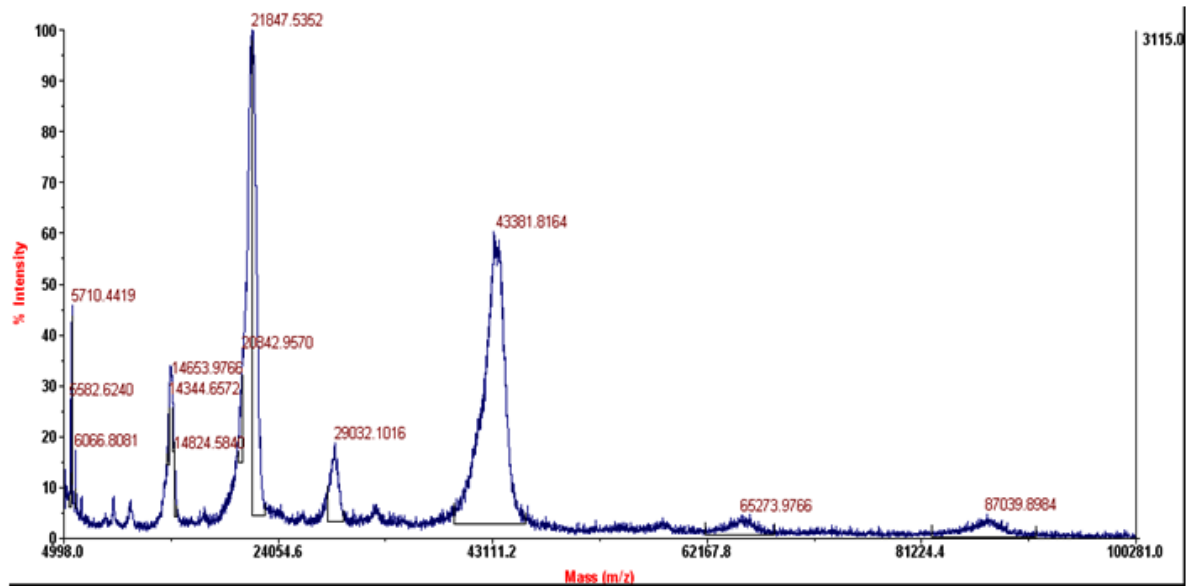
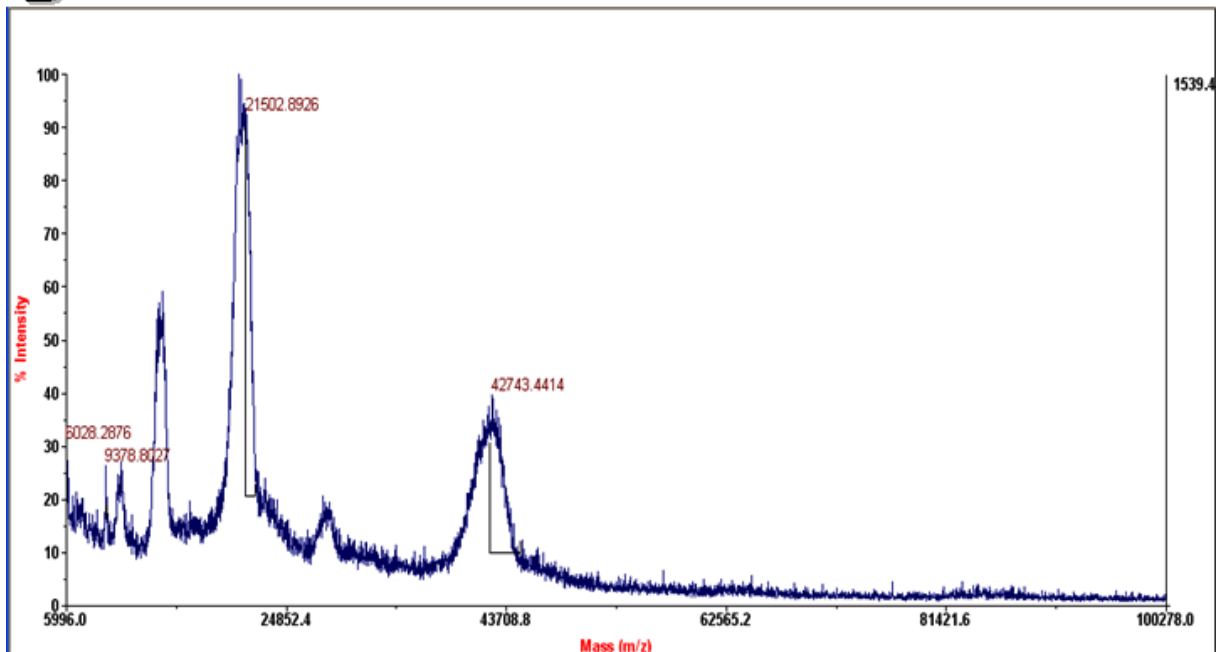
A**B**

Figura 22: Análise por MALDI/TOF de BJ46a parcialmente desglicosilada com neuraminidase + β -galactosidase e com β -N-acetilglicosaminidase.

Painel A: Espectro em modo linear de BJ46a tratada com Neuraminidase e β -Galactosidase;

Painel B: Espectro em modo linear de BJ46a tratada com Neuraminidase, β -Galactosidase e β -N-acetilglicosaminidase.

4.4 – Otimização das condições de desglicosilação extensiva de BJ46a utilizando a glicosidase PNGase F

4.4.1 - Sob condições desnaturantes e redutoras

Para analisar a influência das N-glicosilações para a massa do inibidor, assim como em suas propriedades físico-químicas e biológicas, decidimos estabelecer as condições experimentais para a remoção das N-glicosilações de BJ46a em condições desnaturantes e redutoras com a glicosidase PNGase F. Inicialmente, testamos duas metodologias de desglicosilação, baseadas nas recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich) e nas condições de desglicosilação estabelecidas pelo inibidor de metaloproteinasas DM43 (Léon 2008). Os protocolos incluíram: (a) desnaturação de BJ46a por fervura em presença de SDS e DTT como agente redutor e (b) desnaturação de BJ46a por ureia a 8M e redução das pontes dissulfeto por DTT e alquilação com iodoacetamida. As duas metodologias promoveram a desglicosilação de BJ46a, visto pela mudança na mobilidade eletroforética da banda correspondente à BJ46a tratada com PNGase F em relação à banda de BJ46a controle por SDS-PAGE. Entretanto, nestes experimentos verificou-se uma aparência difusa da banda de BJ46a após a desglicosilação por estas condições, o que sugere que a desglicosilação do inibidor não tenha sido completa (Anexos, **Figura 30** e **Figura 31**).

Portanto, decidimos partir para outra abordagem para desglicosilação de BJ46a baseando-se no uso do surfactante RapiGest SF (Waters). Este surfactante promove a abertura da cadeia polipeptídica, deixando os sítios de N-glicosilação mais susceptíveis à clivagem pela enzima PNGase F. Trabalhos recentes na literatura associam o uso deste reagente à desglicosilação rápida e eficiente de várias proteínas, como a ovalbumina e a proteína ligante de folato (FBP) (Yu *et al.* 2005). Portanto, decidimos avaliar a influência deste reagente na desglicosilação de BJ46a.

Inicialmente, ressolubilizamos uma alíquota de BJ46a e de α -1 glicoproteína humana (40 μ g) em uma solução de de RapiGest a 0,25% (m/v) em 50mM de bicarbonato de amônio, pH 8, seguido de redução e alquilação das cisteínas e incubação com PNGase F (capítulo Materiais e Métodos, seção 3.2.16, protocolo 1).

As amostras foram reduzidas e alquiladas e então incubadas com PNGase F na proporção de 0,5U/μg de glicoproteína por 3h a 37°C. Alíquotas de 2μg de cada proteína controle e tratada com PNGase F foram analisadas por SDS-PAGE, como mostra a **Figura 23**.

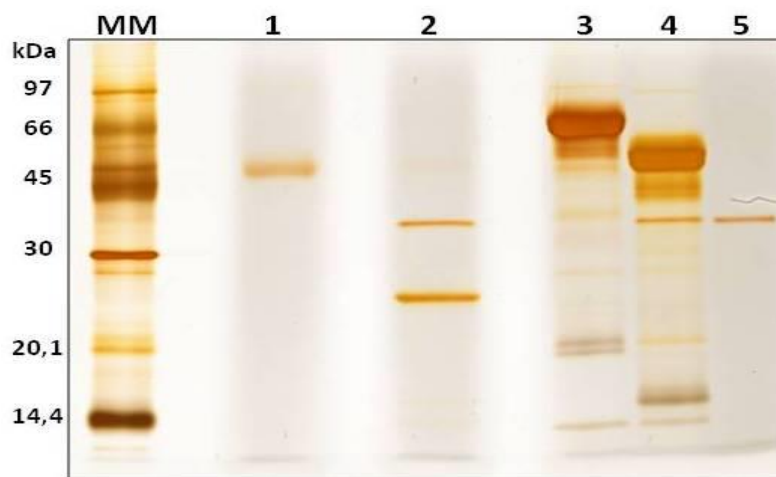


Figura 23: Desglicosilação de α -1 glicoproteína ácida humana e BJ46a na presença de RapiGest SF a 0,25% (p/v).

Raia 1: α -1 glicoproteína ácida controle (2μg); 2: α -1 glicoproteína ácida + 0,5U/μg PNGase F (2μg); 3: BJ46a controle (2μg); 4: BJ46a + 0,5U/μg PNGase F (2μg); 5: PNGase F controle; MM: marcador de massa molecular. Corado por impregnação por prata.

Em relação à α -1 glicoproteína ácida, observamos que, após a desglicosilação por PNGase F (raia 2) detectamos duas bandas: uma de aproximadamente 40kDa, de migração compatível com o controle da enzima PNGase F (raia 5) e uma de aproximadamente 25kDa. Ao calcularmos a massa correspondente à estrutura primária desta proteína, obtemos um valor de 23,5kDa (ExpASy – Compute MW/pI tool), o que indica que este método foi eficiente para a desglicosilação desta proteína.

Ao observarmos a raia 4, que corresponde ao inibidor desglicosilado por PNGase F, obtivemos uma banda majoritária na região entre 66 e 45kDa, bem como outras bandas de menor mobilidade eletroforética (raia 4). Nesta abordagem, a banda correspondente ao inibidor BJ46a desglicosilado se encontra com uma aparência menos difusa em relação às bandas de BJ46a desglicosilada obtidas nas

duas abordagens anteriores. Por outro lado, a presença de bandas de maior mobilidade eletroforética tanto na amostra controle (raia 3) e na amostra desglicosilada (raia 4) apontam para uma aparente degradação da amostra.

Portanto, decidimos aperfeiçoar esta metodologia quanto a concentração de RapiGest SF utilizada, a proporção de PNGase F e tempo de incubação, além de avaliar a influência da redução e alquilação das pontes dissulfeto na desglicosilação de BJ46a. Realizamos um novo ensaio de desglicosilação de BJ46a, utilizando a mesma concentração de surfactante utilizada no ensaio anterior e uma concentração 4 vezes menor, de 0,063% (p/v), com o objetivo de minimizar a aparente degradação de amostra vista no experimento anterior, nas condições descritas no protocolo 2 (capítulo Materiais e Métodos, seção 3.2.16). Alíquotas equivalentes a um micrograma de proteína foram retiradas das amostras nos tempos de 1h e 3h de incubação e então submetidas à análise por SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras, como demonstra a **Figura 24**.

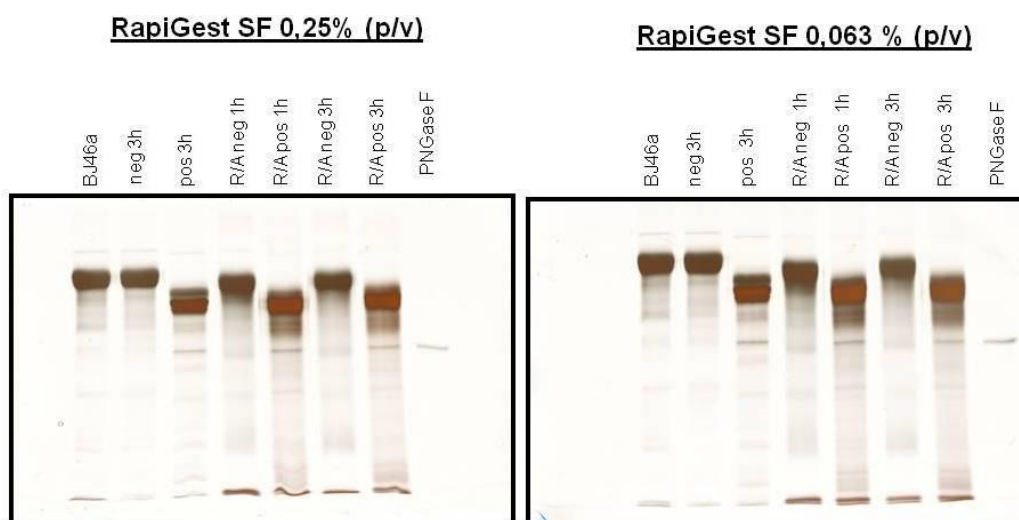


Figura 24: Otimização das condições de desglicosilação de BJ46a em condições desnaturantes e redutoras utilizando o surfactante RapiGest. Nas concentrações de 0,25% e 0,063 (p/v).

BJ46a: BJ46a controle (na ausência do surfactante); R/A: amostras reduzidas com DTT e alquiladas com Iodoacetamida; neg: amostras com surfactante, na ausência de PNGase F ; pos: amostras com PNGase F. Corado por impregnação por prata.

Em ambas concentrações analisadas, o surfactante favoreceu a desglicosilação de BJ46a pela PNGase F, nos dois intervalos de incubação com a glicoamidase. Porém, é interessante notar a influência da redução e alquilação na eficiência de desglicosilação do inibidor. Nas amostras que não foram reduzidas e alquiladas (pos 3h) conseguimos visualizar ao menos três bandas de massas moleculares muito próximas, sugerindo uma desglicosilação parcial de BJ46a, onde estas três bandas representariam formas parcialmente glicosiladas do inibidor. Já para as amostras reduzidas e alquiladas (amostras R/A pos) verificamos a presença de uma única banda. Isso indica que a redução e alquilação das pontes dissulfeto de BJ46a é uma condição necessária para que haja a remoção efetiva das cadeias glicídicas presentes no inibidor. Em relação ao tempo de incubação com a PNGase F, não verificamos mudanças expressivas no perfil eletroforético das amostras incubadas 1h e 3h com a glicoamidase, indicando que ambos os tempos de incubação foram adequados para a remoção das N-glicosilações de BJ46a.

Posteriormente, otimizamos a melhor proporção de enzima/substrato para a desglicosilação de BJ46a com RapiGest. BJ46a e α -1 glicoproteína foram incubadas com RapiGest a 0,063% (p/v), reduzidas, alquiladas e incubadas a 37°C com diferentes proporções de PNGase F como descrito no protocolo 3 (capítulo Materiais e Métodos, seção 3.2.16). Todas as amostras foram analisadas por SDS-PAGE, como demonstra a **Figura 25**.

Todas as proporções de PNGase F testadas foram capazes de promover a desglicosilação de BJ46a, devido à mudança na mobilidade eletroforética do inibidor (painel A) e pela coloração negativa das amostras tratadas com PNGase F pela técnica de coloração por Ácido Periódico / reagente de Schiff (painel B). Para α -1 glicoproteína, as mesmas condições de desglicosilação não foram adequadas para a retirada das cadeias glicídicas desta proteína. Provavelmente, a concentração de surfactante utilizada neste ensaio não foi o suficiente para promover a abertura da estrutura desta proteína e conseqüentemente, facilitar o acesso à porção glicídica pela enzima.

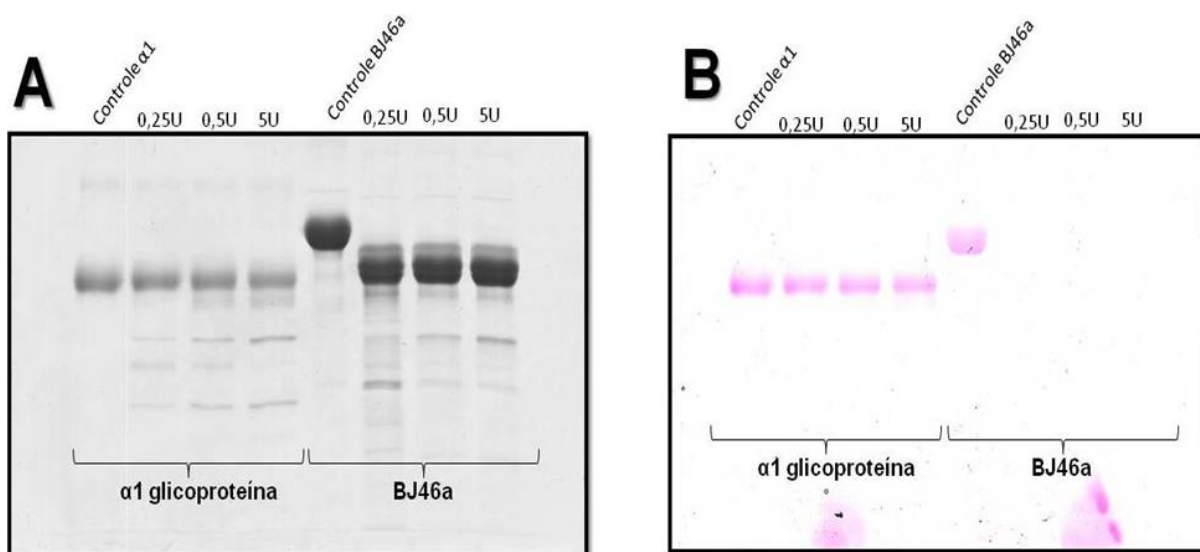


Figura 25: Condições otimizadas de desglicosilação de BJ46a com PNGase F.

0,25U: amostra tratada com PNGase F na proporção de 0,25U/ μ g de glicoproteína; 0,5U: amostra incubada com 0,5U/ μ g e 5U: amostra incubada com 1U/ μ g. Todas as amostras foram tratadas com RapiGest a 0,063% (p/v).

Painel A: gel corado por Coomassie R-250;

Painel B: gel corado pela técnica do Ácido Periódico / reagente de Schiff.

4.4.2 - Sob condições nativas

Para investigarmos a influência da porção glicídica de BJ46a em sua atividade inibitória, decidimos inicialmente estabelecer as condições experimentais adequadas para a desglicosilação extensiva do inibidor em sua forma nativa.

Glicoamidases são frequentemente utilizadas quando se deseja desglicosilar proteínas nativas, devido à propriedade destas enzimas em clivar N-glicosilações independente de sua classe e por induzir modificações pontuais na estrutura proteica – a única modificação induzida por glicoamidases nas proteínas é a desamidação do resíduo de asparagina para ácido aspártico. Por clivar a ligação mais interna da N-glicosilação, as glicoamidases são especialmente sensíveis ao arranjo tridimensional da parte glicídica da glicoproteína – o impedimento estérico pode diminuir ou até mesmo inibir a atividade enzimática (O'Neill 1996).

Devido a esta limitação, optamos por ampliar o acesso a porção glicídica de BJ46a pela PNGase F utilizando as exoglicosidases neuraminidase, $\beta(1\rightarrow4)$ galactosidase e β -N-acetilglicosaminidase. A ação destas três enzimas reduz a porção glicídica do inibidor ao núcleo da N-glicosilação, facilitando a clivagem da ligação GlcNAc- β 1-Asn pela PNGase F. Incubamos BJ46a com neuraminidase, $\beta(1\rightarrow4)$ Galactosidase, β -N-acetilglicosaminidase e PNGase F nas proporções de 0,00006U, 0,000035U, 0,00046U e 0,06U por micrograma de glicoproteína, respectivamente, por 120h a 37°C. Alíquotas equivalentes a 2 μ g de proteína foram retiradas a cada 24h e analisadas por MALDI/TOF no modo linear, como demonstra a **Figura 26**.

Nas primeiras 24h de incubação com as exoglicosidases e PNGase F, verificamos uma desglicosilação significativa de BJ46a. Após este período, a massa do monômero do inibidor foi calculada em 39632 Da (**Figura 26**, painel B), uma redução de aproximadamente 5 kDa em relação à massa registrada para BJ46a controle (**Figura 26**, painel A). Nos pontos subsequentes, a diferença em massa não é muito proeminente, indicando que a maior parte dos glicanos de BJ46a foram clivados em 24h de incubação. Nestes pontos, a massa calculada do monômero de BJ46a se mantém próximo a 39 kDa.

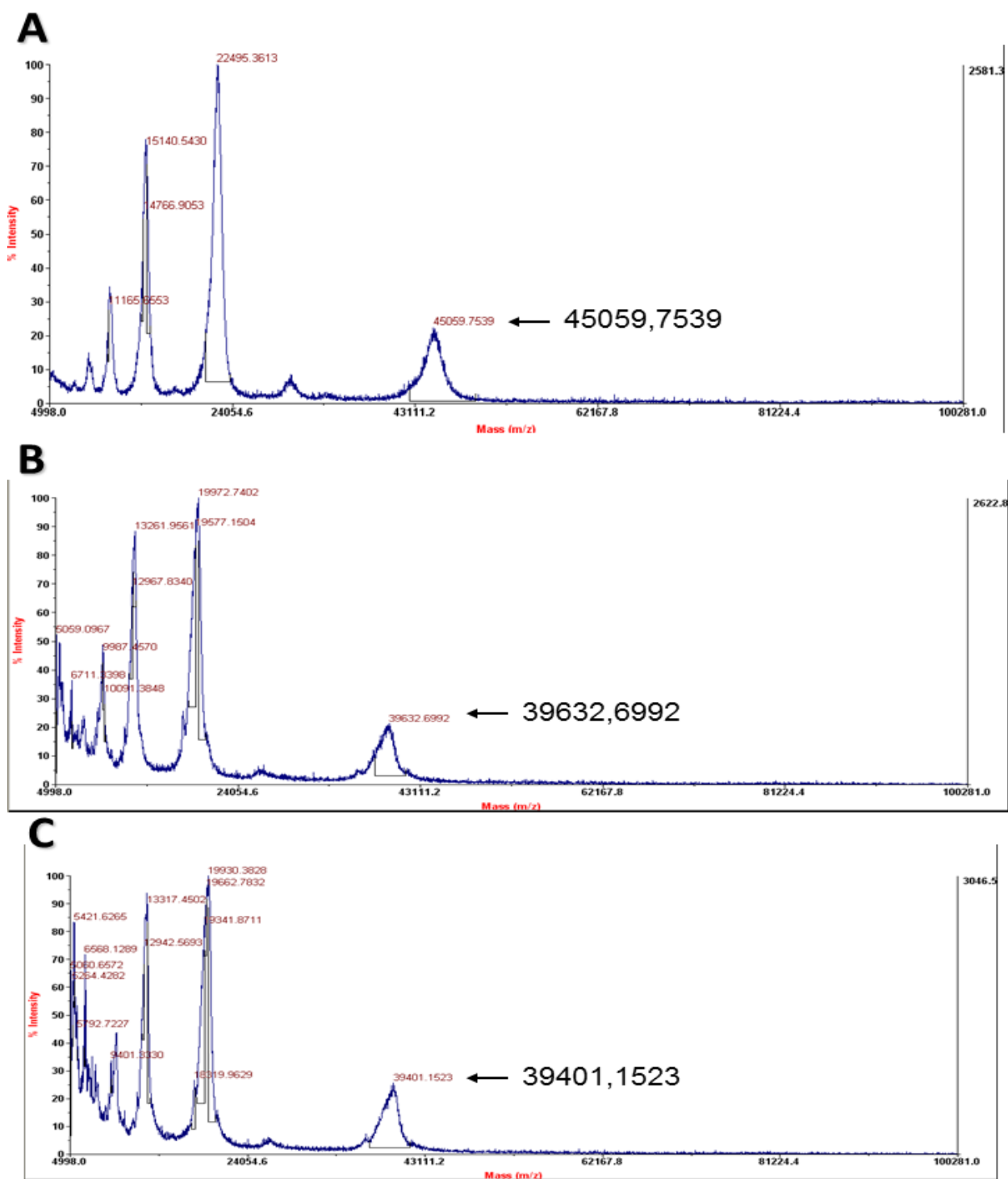


Figura 26: Espectros em modo linear de BJ46a desglicosilada com exoglicosidases e PNGase F.

Painel A: BJ46a controle;

Painel B: BJ46a após 24h de incubação com as exoglicosidases / PNGase F;

Painel C: BJ46a após 48h de incubação com as glicosidases.

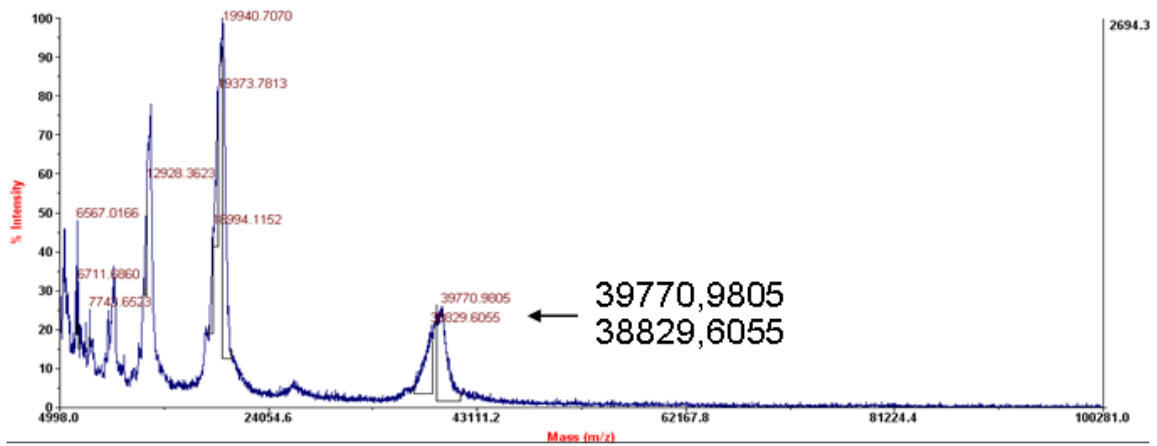
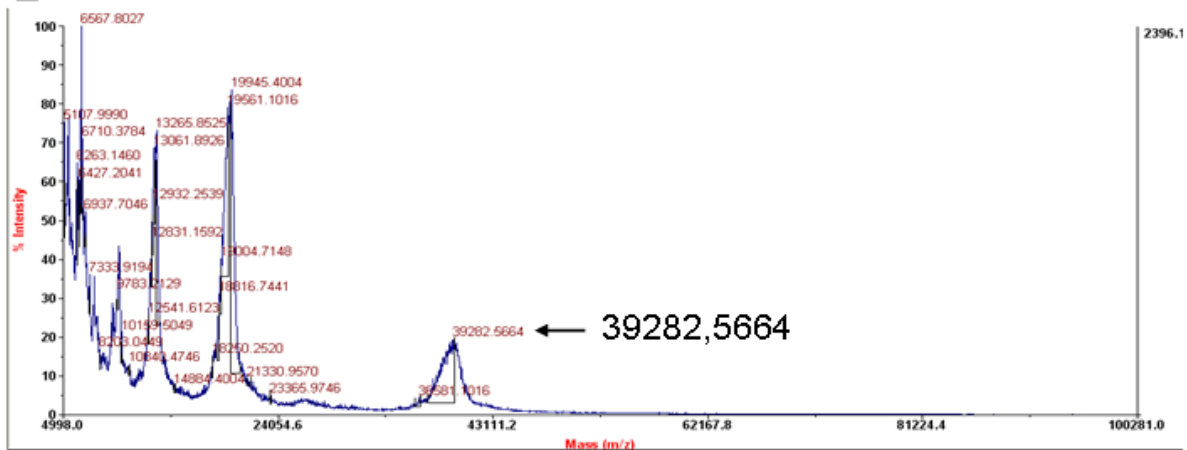
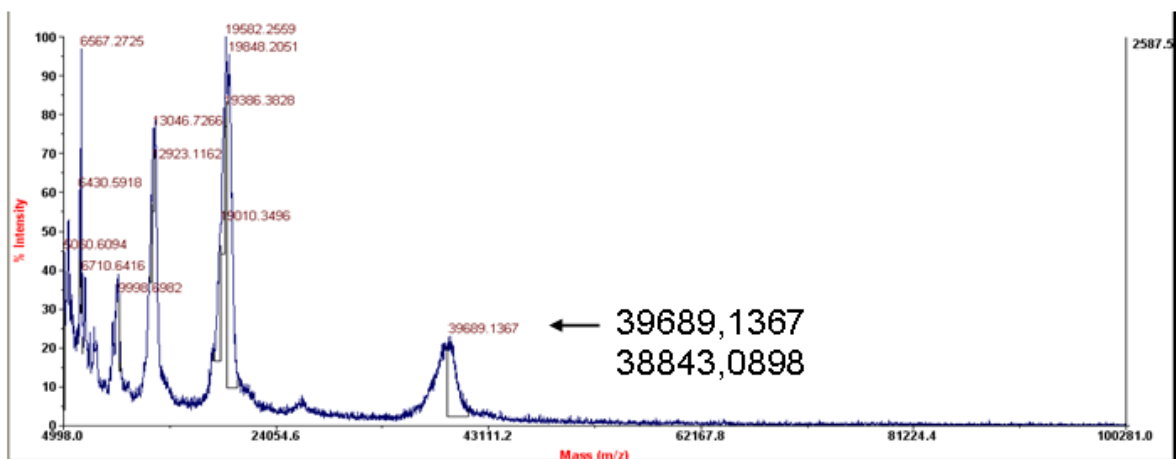
D**E****F**

Figura 26: Espectros em modo linear de BJ46a desglicosilada com exoglicosidasas e PNGase F

Painel D: BJ46a após 72h de incubação com as exoglicosidasas / PNGase F;
 Painel E: BJ46a após 96h de incubação com as glicosidasas;
 Painel F: BJ46a após 120h de incubação com as glicosidasas.

Sete microgramas do inibidor em sua forma nativa e após a incubação com as exoglicosidases e PNGase F por 72h a 37°C foram submetidos à eletroforese em condições desnaturantes e redutoras, como demonstra a **Figura 27**. Há um incremento significativo da mobilidade eletroforética do inibidor após o tratamento com as glicosidases; nesta técnica, a massa molecular aparente do inibidor nativo foi calculada em 60,2 kDa e, após o tratamento com exoglicosidases e PNGase F, a massa do inibidor foi estimada em 50,4kDa, uma redução de aproximadamente 16% (**Figura 27**, painel A). Por densitometria, verificamos que o volume relativo da banda de BJ46a, após o tratamento com as glicosidases, foi calculada em 15,3% (**Tabela 8**). Entretanto, quando coramos o gel pela técnica do ácido periódico / reagente de Schiff, verificamos que após a incubação com as glicosidases, BJ46a ainda se mostrou positiva para glicosilação, ainda que a coloração tenha sido significativamente menos intensa em relação ao controle (**Figura 27**, painéis B e C). Esta forma parcialmente desglicosilada de BJ46a poderia representar a permanência de carboidratos em um ou mais sítios previamente glicosilados de BJ46a.

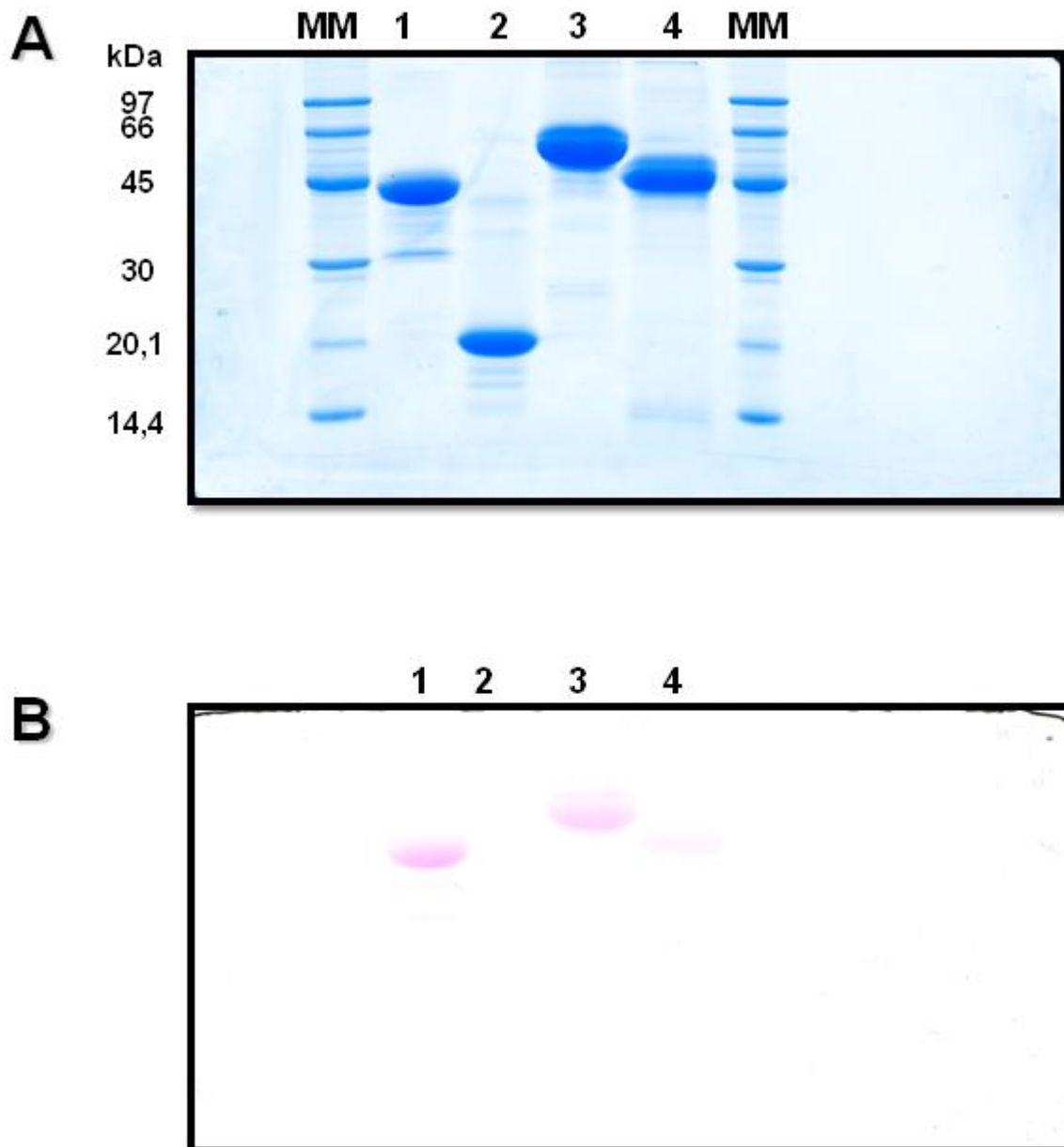


Figura 27: Análise por SDS-PAGE de BJ46a nativa e após desglicosilação com exoglicosidases e PNGase F em condições nativas.

Amostra 1: Peroxidase de raiz-forte (controle positivo da coloração por ácido periódico / reagente de Schiff – 7 μ g); amostra 2: Inibidor tróptico de soja (controle negativo da coloração por ácido periódico / reagente de Schiff – 7 μ g); amostra 3: BJ46a nativa (7 μ g); amostra 4: BJ46a parcialmente desglicosilada com exoglicosidases e PNGase F.

Painel A: gel corado por Coomassie G-250;

Painel B: gel corado por ácido periódico / reagente de Schiff;

Tabela 8: Volumes normalizados das bandas de BJ46a nativa (raia 3) e desglicosilada com exoglicosidasas (raia 4) exibidas no painel B da figura 25.

Raia	Volume normalizado (%)
3	100
4	15,3

4.5 - Análise da relevância da porção glicídica de BJ46a para sua atividade inibitória

Os oligossacarídeos podem ter o potencial de influenciar de maneira significativa diversas propriedades físico-químicas e biológicas das proteínas às quais estão covalentemente ligados. A descoberta de várias rotas de enovelamento e degradação dependentes de glicanases no retículo endoplasmático indica que os açúcares N-ligados podem ter um papel central durante o enovelamento proteico, favorecendo algumas conformações em detrimento de outras e promovendo mudanças na estrutura secundária local (Mitra *et al.* 2006; Molinari 2007). Além disso, oligossacarídeos N-ligados são estruturas grandes e hidrofílicas – um glicídeo complexo triantenário pode chegar a ter 2,9 kDa – o que pode proteger a glicoproteína de hidrólise por proteases, de interações não-específicas e modular sua atividade biológica (Imperiali e O'Connor 1999; Skropeta 2009).

Para DM43, um inibidor natural de metaloproteinasas de venenos de serpentes isolado do soro do gambá *Didelphis aurita*, León e colaboradores demonstraram que a remoção dos resíduos de ácido siálico e galactose não impediu a interação com a SVMP jararagina, nem a inibição da atividade azocaseinolítica desta toxina. Entretanto, a desglicosilação parcial de DM43 com PNGase F levou à uma perda de 50% da capacidade inibitória de DM43 sobre a atividade azocaseinolítica de jararagina (León *et al.* 2012). Estes resultados nos levaram a

analisar qual seria a relevância das cadeias glicídicas presentes em BJ46a em sua atividade biológica.

Para realizarmos nossos estudos, desglicosilamos 60 μg do inibidor com neuraminidase, β -galactosidase, β -N-acetilglicosaminidase e PNGase F por 72h a 37°C. Nossa análise inicial consistiu em um ensaio de formação de complexos entre BJ46a em suas formas nativas e desglicosilada com a SVMP jararagina. Incubamos BJ46a e jararagina na proporção molar de 1:1 (subunidade do inibidor: toxina) por 30 min a 37°C e o conteúdo de cada reação foi analisado por eletroforese em condições nativas, como mostra a **Figura 28**.

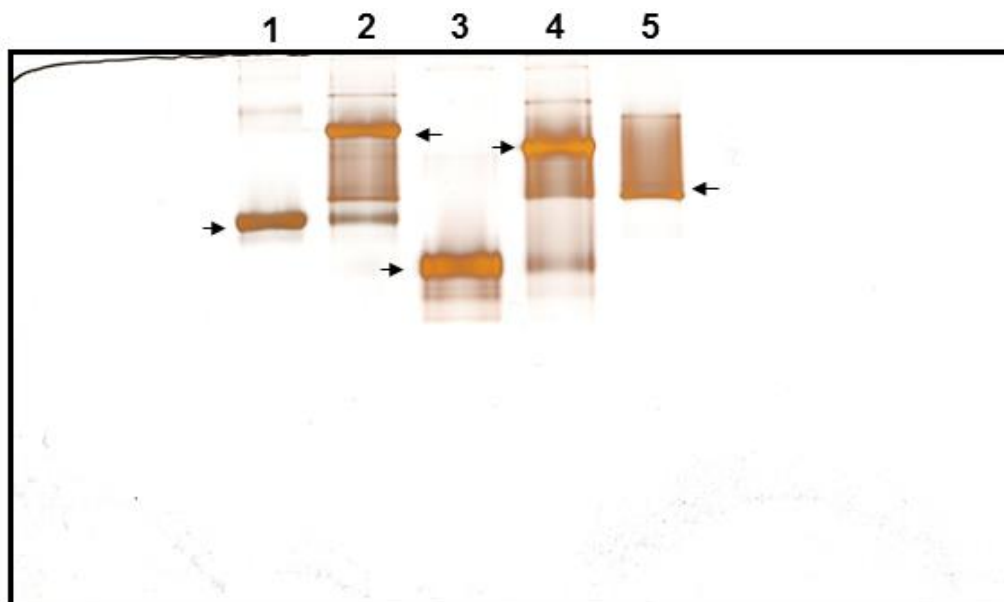


Figura 28: Ensaio de formação de complexos entre BJ46a nativa, BJ46a desglicosilada por exoglicosidases e PNGase F com a SVMP jararagina.

Raia 1: BJ46a nativa (1 μg); 2: BJ46a nativa e jararagina (1:1); 3: BJ46a desglicosilada (1 μg); 4: BJ46a desglicosilada e jararagina (1:1); 5: Jararagina (1,1 μg). Corado por impregnação por prata. As bandas indicadas por setas foram excisadas do gel e seu conteúdo identificado por espectrometria de massas.

É possível visualizar, na raia 2, a aparição de uma banda de menor mobilidade eletroforética, que não está presente na amostra correspondente ao inibidor em sua forma nativa (raia 1) e a amostra correspondente a jararagina isolada (raia 5).

Quando desglicosilamos BJ46a, verificamos uma mudança na migração da banda de BJ46a no gel nativo (raia 3) e, quando incubamos o inibidor extensivamente desglicosilado com jararagina (raia 4), verificamos novamente a formação de uma banda de menor mobilidade, ausente nos controles do inibidor desglicosilado e toxina, sugerindo a formação de complexo entre estas duas proteínas. Quando tripsinizadas e analisadas por espectrometria de massas, as bandas contidas nas raias 2 e 4 continham peptídeos trípticos provenientes tanto de jararagina quanto de BJ46a (**Tabela 9**). Estes resultados indicam que a desglicosilação extensiva do inibidor não interferiu em sua capacidade de interação com a SVMP jararagina, e que provavelmente a atividade biológica do inibidor deve estar mantida.

Para confirmarmos esta hipótese, realizamos um ensaio de atividade com jararagina, utilizando-se azocaseína como substrato, na presença de BJ46a nativa e BJ46a desglicosilada em duas proporções molares distintas (1:1 e 2:1, subunidade do inibidor:toxina), e os resultados estão demonstrados na **Figura 29**.

Tabela 9: Identificação do conteúdo protéico das bandas excisadas do gel exibido na figura 28 por nanoLC-nanospray-LTQ-Orbitrap.

Amostra	Nº de Acesso (gi)	-10logP (PEAKS)	Cobertura (%)	Número de peptídeos	Massa Teórica (Da)	Descrição
Controle negativo *	269849769	166,36	30%	21	58.827	Keratin, type I cytoskeletal 10
Amostra 01	48428681	252,10	74%	66	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
Amostra 02	484228661	215,78	68%	48	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
	82190823	199,16	41%	46	68.213	Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin
Amostra 03	231997	190,87	33%	39	63.983	Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin
	484228666	227,65	72%	48	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
Amostra 04	484228661	199,04	67%	38	38.779	Antihemorrhagic factor BJ46a
	231997	149,49	32%	36	63.983	Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin
Amostra 05	82190823	173,80	42%	54	68.213	Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin
	231997	171,83	42%	48	63.983	Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin

* - Nesta amostra, excisamos um pequeno pedaço da malha do gel de poliacrilamida que não continha bandas como controle negativo da digestão trípica.

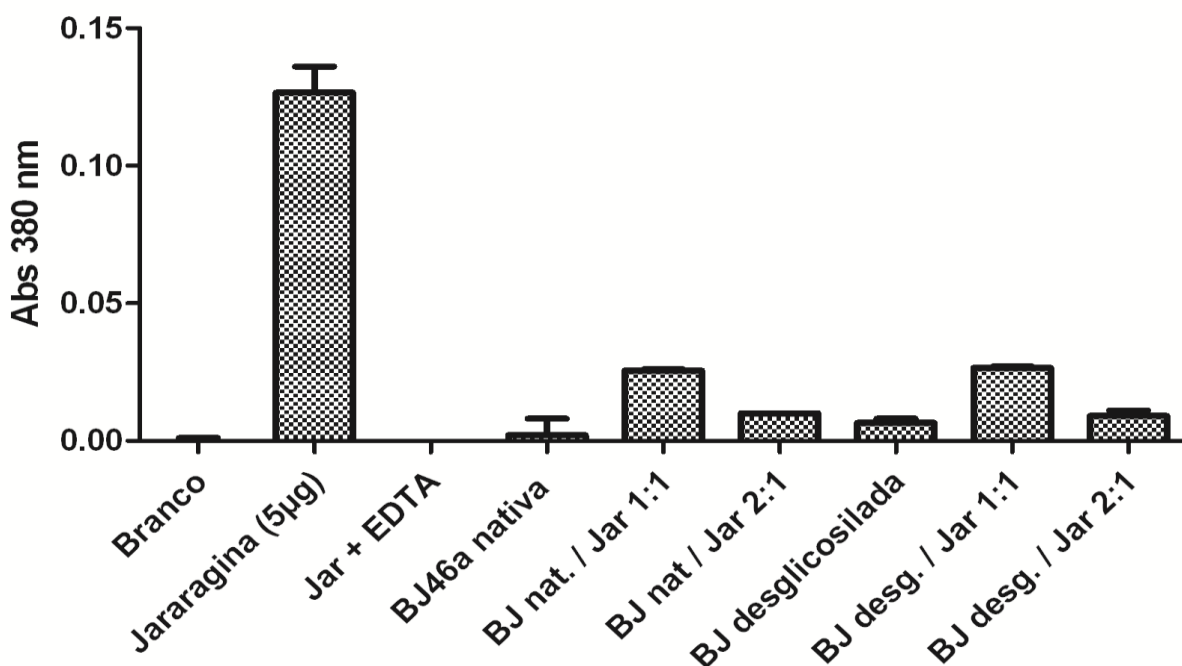


Figura 29: Ensaio de inibição de atividade azocaseinolítica da SVMP jararagina por BJ46a nativa e BJ46a extensivamente desglicosilada por exoglicosidases e PNGase F.

Como podemos verificar, tanto BJ46a em sua forma nativa quanto BJ46a desglicosilada por exoglicosidases e PNGase F foi capaz de inibir de maneira significativa a atividade proteolítica de jararagina sobre azocaseína em ambas as proporções inibidor:toxina testadas. Apesar de nossa metodologia de desglicosilação de BJ46a em condições nativas não levar à obtenção de uma forma completamente desglicosilada de BJ46a (**Figura 27**), nossos resultados indicam que, diferentemente de DM43, a parte glicídica de BJ46a não apresenta uma relevância direta para a atividade biológica. Para alguns inibidores naturais de fosfolipase A₂, já há evidências na literatura de que a glicosilação destas proteínas pode não ser crucial para o reconhecimento de PLA₂ (Fortes-Dias 2002).

Estudos envolvendo mutagênese sítio-dirigida com a renina humana indicaram que, apesar dos glicídeos não estarem envolvidos diretamente com a atividade enzimática, a secreção da proteína não glicosilada foi comprometida. Para a glicoproteína M, proteína de superfície do vírus da hepatite B, o tratamento das células hospedeiras com inibidores de glicosidases do retículo endoplasmático inibiu o enovelamento correto da proteína e sua secreção, levando à formação de agregados intracelulares da glicoproteína M (Lazar *et al.* 2007; Skropeta 2009). É

possível que a N-glicosilação de BJ46a também tenha um papel importante para o correto enovelamento da proteína, pelas vias dependentes de glicanases e das chaperonas calnexina / calreticulina e para seu tráfego e secreção para o meio extracelular, uma vez que temos evidência da síntese de BJ46a no fígado da serpente e sua secreção para o plasma (Valente *et al.* 2001).

Além disso, para glicoproteínas plasmáticas, os oligossacarídeos N-ligados podem ser cruciais para a estabilidade. Por serem estruturas grandes, os glicanos são capazes de proteger a superfície proteica, protegendo a glicoproteína de hidrólises (Rudd *et al.* 2001). Os resíduos de ácido siálico presentes na parte glicídica diminuem a taxa de *clearance* (depuração) destas proteínas da circulação sanguínea, por impedir a interação com lectinas presentes na superfície dos hepatócitos (receptor de assialoglicoproteína) e das células de Kupffer, que reconhecem resíduos de galactose e N-acetilglicosamina terminais. Uma menor taxa de *clearance* destas glicoproteínas por estas células leva ao aumento da meia-vida plasmática destas moléculas (Byrne *et al.* 2007; Li e d'Anjou 2009; Sørensen *et al.* 2012).

Os inibidores naturais de venenos de serpentes atuam como aceptores solúveis, circulantes no plasma de animais resistentes e prontos para formar complexos inativos com metaloproteinases ou fosfolipases A₂, endógenas ou não, que entrem na corrente sanguínea (Perales *et al.* 2005). Então, uma meia-vida plasmática prolongada ampliaria o efeito protetor destes inibidores frente a estas toxinas.

A manutenção da atividade inibitória de BJ46a, mesmo após desglicosilação extensiva, indica que as regiões de interação entre inibidor-toxina estão contidas na parte proteica de BJ46a. Para HSF, inibidor que apresenta 85% de identidade de sequência com BJ46a, Aoki e colaboradores demonstraram que a extremidade N-terminal do primeiro domínio tipo-cistatina de HSF é essencial para manutenção de sua atividade antihemorrágica. Análises por modelagem molecular indicaram que o *cluster* dos resíduos Trp17, Trp48, Lys15 e Lys41 expostos na superfície de HSF estaria relacionado com a atividade inibitória de HSF (Aoki *et al.* 2007). É possível que BJ46a também interaja com as SVMP por este mesmo grupamento, uma vez que o inibidor possui estes resíduos nas mesmas posições (Valente *et al.* 2009).

5 – CONCLUSÕES

- Implementamos uma metodologia otimizada para purificação do inibidor BJ46a, com menor manipulação de amostra e com rendimento purificativo próximo ao do método originalmente publicado;
- Em nossos ensaios de interação, BJ46a foi capaz de formar complexos não-covalentes com as SVMP de classe PI atroxlisina-I, BaP1 e leucurolisina-a, inibindo sua atividade fibrinogenolítica. BJ46a interagiu com a SVMP de classe PIII jararagina em uma estequiometria de 1:1 (subunidade do inibidor: toxina) e inibiu a atividade proteolítica desta toxina sobre azocaseína;
- Confirmamos experimentalmente os sítios de N-glicosilação de BJ46a, localizados nas posições Asn76, Asn185, Asn263 e Asn274;
- A parte glicídica de BJ46a é composta primariamente de N-glicosilações do tipo complexo, contendo ácido siálico no terminal redutor. A presença deste resíduo pode colaborar para uma menor taxa de *clearance* e, conseqüentemente, uma maior meia-vida plasmática do inibidor, o que prolongaria seu efeito protetor frente às toxinas;
- Estabelecemos as condições experimentais para a remoção das N-glicosilações contidas em BJ46a em condições desnaturantes pela glicosidase PNGase F (na presença do surfactante RapiGest) e em condições nativas, por uma incubação prolongada do inibidor (72h) com exoglicosidases e PNGase F;
- BJ46a extensivamente desglicosilada em condições nativas foi capaz de formar complexos com a SVMP jararagina e inibir sua atividade azocaseínolítica, indicando que a N-glicosilação de BJ46a pode não ser um fator determinante para a inibição de SVMP.

6 - PERSPECTIVAS

A manutenção da atividade inibitória de BJ46a, mesmo após desglicosilação extensiva aponta para a porção proteica do inibidor como parte fundamental para o mecanismo de inibição de SVMP. Por isso, temos como perspectiva analisar a interação de BJ46a com SVMP utilizando as técnicas de *crosslinking* e troca isotópica hidrogênio / deutério. Aliadas à espectrometria de massas, estas abordagens fornecerão informações importantes sobre as regiões de interação entre BJ46a e SVMP e sobre a dinâmica conformacional de BJ46a isolada e em complexo com a toxina. Além disso, a determinação das condições experimentais para a desglicosilação extensiva do inibidor em condições nativas pode viabilizar o estudo da estrutura tridimensional de BJ46a por cristalografia de raios X.

Paralelamente, realizaremos hidrólises do inibidor com diferentes proteinases (Arg-C, Lys-C, Asp-N, papaína, tripsina) e por métodos químicos (ácido 2-iodosobenzóico) com o objetivo de determinar a porção mínima do inibidor capaz de manter sua atividade biológica. Os fragmentos de BJ46a com atividade inibitória serão caracterizados e sintetizados. Eventualmente, estes peptídeos poderão servir de molde para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos específicos, capazes de modular a atividade de metaloproteinases de venenos de serpentes e seus homólogos.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Applied Biosystems. Voyager Biospectrometry Workstation. United States; 2000. 738p.
2. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Acesso em: 24/4/2014. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.
3. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. Trends in Biochemical Sciences. 2009;35(2):74-82.
4. Aoki N, Deshimaru M, Terada S. Active fragments of the antihemorrhagic protein HSF from serum of habu (*Trimeresurus flavoviridis*). Toxicon. 2007 Apr;49(5):653-62.
5. Apweiler R, Hermjakob R, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced by analysis of the SWISS-PROT database. Biochim Biophys Acta. 1999;1473:4-8.
6. Battellino C, Piazza R, Silva AMM, Cury Y, Farsky SHP. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom Toxicon. 2003;41:583-93.
7. Bause E, Legler G. The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis. Biochem J. 1981;195:639-44.
8. Byrne B, Donohoe GG, O'Kennedy R. Sialic Acids: Carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. Drug Discovery Today. 2007;12(8):319-26.
9. Calmette A. Propriétés du sérum des animaux immunisés contre le venin des serpents et thérapeutique de l'envenimation. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 1894;118:720-2.

10. Clissa PB, Laing GD, Theakston RD, Mota I, Taylor MJ, Moura-da-Silva AM. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon*. 2001 Oct;39(10):1567-73.
11. Cominetti MR. Caracterização da atividade proteolítica de toxinas e uso de inibidores. In: Selistre-de-Araújo HS, Ferreira de Souza DH, eds. *Métodos em Toxinologia: toxinas de serpentes*. São Carlos: Editora UFSCar; 2007. p. 45-51.
12. Cruz LS, Lopes AA. Snakebite Envenomation and Death in the Developing World. *Ethnicity & Disease* 2009;19:S142-S6.
13. de Oliveira RC, Wen FH, Sifuentes DN. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: Cardoso JL, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, eds. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2 ed. São Paulo: Sarvier; 2009. p. 6-21.
14. Deshimaru M, Tanaka C, Fujino K, Aoki N, Terada S, Hattori S *et al*. Properties and cDNA cloning of an antihemorrhagic factor (HSF) purified from the serum of *Trimeresurus flavoviridis*. *Toxicon*. 2005;46:937-45.
15. Deshimaru M, Tanaka C, Tokunaga A, Goto M, Terada S. Efficient Purification of an Antihemorrhagic factor in the serum of Japanese Habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Fukuoka Uni Sci Rep*. 2003;33(2):45-53.
16. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM Metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*. 2008;29:258-89.
17. Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutierrez JM. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics*. 2011 Aug 24;74(9):1781-94.

18. Espino-Solis GP, Riano-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. *J Proteomics*. 2009 Mar 6;72(2):183-99.
19. Fortes-Dias CL. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A₂ in the blood plasma of snakes. *Toxicon*. 2002;40(5):481-4.
20. Fox JW, Serrano SM. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. 2005 Jun 15;45(8):969-85.
21. Fox JW, Serrano SM. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J*. 2008 Jun;275(12):3016-30.
22. Freeze HH, Haltiwanger RS. Other Classes of ER/Golgi Derived Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., eds. *Essentials of Glycobiology - Second Edition*. New York: Cold Spring Harbor; 2009.
23. Geiger T, Clarke S. Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginyl and Aspartyl Residues in Peptides *The Journal of Biological Chemistry*. 1987;262(2):785-94.
24. Girish KS, Kemparaju K. Overlooked Issues of Snakebite Management: Time for Strategic Approach. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2011;11:2494-508.
25. Gutierrez JM. Envenenamientos por mordedura de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2011;51(1):1-16.
26. Gutierrez JM. Snakebite Envenoming: A Public Health Perspective. InTech; 2012. Disponible em: <http://www.intechopen.com/books/public-health-methodology-environmental-and-systems-issues/snakebite-envenoming-a-public-health-perspective>.

27. Gutierrez JM, Lomonte B, Leon G, Rucavado A, Chaves F, Angulo Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. *Curr Pharm Des.* 2007;13(28):2935-50.
28. Gutierrez JM, Romero M, Díaz 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.* 1995;33(1):19-29.
29. Gutierrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie.* 2000 Sep-Oct;82(9-10):841-50.
30. Gutierrez JM, Rucavado A, Escalante T. Snake Venom Metalloproteinases - Biological Roles and Participation in the Pathophysiology of Envenomation. In: Mackessy SP, editor. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles.* Boca Raton: CRC Press; 2010. p. 115-38
31. Gutierrez JM, Warrell DA, Williams D, Jensen S, Brown N, Calvete JJ *et al.* The Need for Full Integration of Snakebite Envenoming within a Global Strategy to Combat the Neglected Tropical Diseases: The Way Forward. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(6):e2162.
32. Hao P, Ren Y, Alpert AJ, Sze SK. Detection, Evaluation and Minimization of Nonenzymatic Deamidation in Proteomic Sample Preparation. *Molecular and Cellular Proteomics.* 2011;10:1-11.
33. Harrison RA, Cook DA, Renjifo C, Casewell NR, Currier RB, Wagstaff SC. Research strategies to improve snakebite treatment: challenges and progress. *Journal of Proteomics.* 2011;74:1768-80.
34. Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Laloo DG. Snake Envenoming: A disease of poverty. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(12):e569.

35. Harvey DG, Wing DR, Küster B, Wilson IBH. Composition of N-linked Carbohydrates from ovalbumin and co-purified glycoproteins. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2010;11(1):564-771.
36. Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of protein in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis.* 1985;6:103-12.
37. Hite LA, Jia L-G, Bjarnason JB, Fox JW. cDNA sequences for four Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Classification, and Their Relationship to Mammalian Reproductive Proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1994;308(1):182-91.
38. Holcapek M, Jirásko R, Lísa M. Recent developments in liquid-chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A.* 2012;1259:3-15.
39. Imperiali B, O'Connor SE. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current Opinion in Chemical Biology.* 1999;3:643-9.
40. Ji M-K, Shi Y, Xu J-W, Lin X, Lin J-Y. Recombinant snake venom metalloproteinase inhibitor BJ46A inhibits invasion and metastasis of B16F10 and MHCC97H cells through reductions of matrix metalloproteinases 2 and 9 activities. *Anticancer Drugs.* 2013;24(5):461-72.
41. Kameoka D, Ueda T, Imoto T. A Method for the Detection of Asparagine Deamidation and Aspartate Isomerization of Proteins by MALDI/TOF-Mass Spectrometry Using Endoproteinase Asp-N. *J Biochem.* 2003;134:129-35.
42. Kamiguti AS. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon.* 2005;45(1):1041-9.

43. Kamiguti AS, Hay CRM, Theakston RD, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 1996;34(6):627-42.
44. Kamiya Y, Satoh T, Kato K. Molecular and structural basis for N-glycan-dependent determination of glycoprotein fates in cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1820:1327-37.
45. Kasturiatne A, Wickremasinghe R, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R *et al*. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Med*. 2008;5(11):1591-604.
46. Kobata A, Takasaki S. Structural characterization of oligosaccharides from glycoproteins - Glycosidase treatment and other methods, including methylation analysis. In: Fukuda M, Kobata A, editores. *Glycobiology: A Practical Approach*. New York: IRL Press; 1993.
47. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
48. Lazar C, Durantel D, Macovei A, Zitzmann N, Zoulim F, Dwek RA *et al*. Treatment of hepatitis-B virus-infected cells with α -glucosidase inhibitors results in the production of virions with altered molecular composition and infectivity. *Antiviral Research*. 2007;76:30-7.
49. Léon I. Caracterização da N-glicosilação de DM43 e DM64 por Espectrometria de Massas e Análise de sua Contribuição para a Atividade Antiofídica destas Proteínas. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz; 2008.
50. León IR, Neves-Ferreira AGC, Rocha SLG, Trugilho MRO, Perales J, Valente RH. Using mass spectrometry to explore the neglected glycan moieties of the antiophidic proteins DM43 and DM64. *Proteomics*. 2012;12:2753-65.

51. Li H, d'Anjou M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009;20:678-84.
52. Li X, Cournoyer JJ, Lin C, O'Connor PB. Use of ¹⁸O Labels to Monitor Deamidation during Protein and Peptide Sample Processing. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2008;19:855-64.
53. Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature Chemical Biology*. 2010;6:713-23.
54. Medzihradszky KF. Characterization of protein N-glycosylation. *Methods Enzymol*. 2005;405:116-38.
55. Mitra N, Sinha S, Ramya TNC, Surolia A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006;31(3):156-63.
56. Molinari M. N-glycan structure dictates extension of protein folding and onset of disposal. *Nature Chemical Biology*. 2007;3(6):313-20.
57. Morais VM, Massaldi H. Snake Antivenoms: Adverse Reactions and Production Technology. *Journal of Venomous Animals Including Tropical Diseases*. 2009;15(1):2-18.
58. Moreira L, Borkow G, Ovadia M, Gutierrez JM. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon*. 1994;32(8):976-87.
59. Morelle W, Michalski J-C. The Mass Spectrometric Analysis of Glycoproteins and their Glycan Structures. *Current Analytical Chemistry*. 2005;1:29-57.

60. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews*. 2012;13:448-62.
61. Moura-Da-Silva AM, Serrano SM, Fox JW, Gutierrez JM. Snake Venom Metalloproteinases: Structure, function and effects on snake bite pathology. In: Lima ME, editor. *Animal Toxins: State of the Art Perspectives in Health and Biotechnology*. Belo Horizonte: Editora UFMG; 2009. p. 525-46.
62. Mulloy B, Hart GW, Stanley P. Structural Analysis of N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editors. *Essentials of Glycobiology - 2nd Edition*. New York: Cold Spring Harbor; 2009. p. 784.
63. Neves-Ferreira AGC, Cardinale N, Rocha SLG, Perales J, Domont GB. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum *Biochim Biophys Acta*. 2000;1474(3):309-20.
64. Neves-Ferreira AGC, Perales J, Fox JW, Shannon JD, Makino DL, Garratt RC *et al*. Structural and Functional Analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum. . *J Biol Chem*. 2002;277:13129-37.
65. Neves-Ferreira AGC, Valente RH, Perales J, Domont GB. Natural Inhibitors - Innate Immunity to Snake Venoms. In: Mackessy SP, editor. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. Boca Raton: CRC Press; 2010. p. 259-84.
66. Nicolau CA. Aplicação da tecnologia OFFGEL para determinação do proteopeptidoma do veneno de *Bothrops jararaca*: uma nova abordagem em venômica de serpentes. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Bioquímica] - Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2012.
67. O'Neill RA. Enzymatic Release of oligossacharides from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analyses. *Journal of Chromatography A*. 1996;720:201-15.

68. Omori-Satoh T, Yamakawa Y, Mebs D. The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. *Toxicon*. 2000;38:1561-80.
69. Pace AL, Wong RL, Zhang YT, Kao YH, John Wang Y. Asparagine deamidation dependence on buffer type, pH and temperature. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;102(6):1712-23.
70. Paine MJ, Desmond HP, Theakston RDG, Crampton JM. Purification, Cloning and Molecular Characterization of a High Molecular Weight Hemorrhagic Metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* Venom. *J Biol Chem*. 1992;267(32):22869-76.
71. Palmisano G, Melo-Braga MN, Engholm-Keller K, Parker BL, Larsen MR. Chemical deamidation: A Common Pitfall in Large-Scale N-linked Glycoproteomic Mass Spectrometry-based Analyses. *J Proteome Res*. 2012;11:1949-57.
72. Pasing Y, Sickmann A, Lewandrowski U. N-Glycoproteomics: mass spectrometry-based glycosylation site annotation. *Biol Chem*. 2012;393:249-58.
73. Perales J, Neves-Ferreira AGC, Valente RH, Domont GB. Natural Inhibitors of Snake Venom Hemorrhagic Metalloproteinases. *Toxicon*. 2005;45:1013-20.
74. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS Metalloproteinases. *Biochem J*. 2005;386:15-27.
75. Portes-Junior JA, Yamanouye N, Carneiro SM, Kinittel PS, Sant'Anna SS, Nogueira FC *et al*. Unraveling the Processing and Activation of Snake Venom Metalloproteinases. *J Proteome Res*. 2014;13(7):3338-48.
76. Preston RJS, Rawley O, Gleeson EM, O'Donnell JS. Elucidating the roles of carbohydrate determinants in regulating hemostasis: insights and opportunities. *Blood*. 2013;121(19):3801-10.

77. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FCV, Furtado MFD, Tambourgi DV. Interspecific Variation in Venom Composition and Toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*. 2008;52:842-51.
78. Rabilloud T, Charmont S. Detecton of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. In: Rabilloud T, editor. *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods*. New York: Springer; 2000. p. 107-26.
79. Rahman R, Faiz MA, Selim S, Rahman B, Basher A, Jones A *et al*. Annual Incidence of Snake Bite in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(10):e860.
80. Ramos OHP, Carmona AK, Selistre-de-Araújo HS. Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom pro-metalloprotease. *Protein Expression & Purification* 2003;28:34-41.
81. Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. Glycosylation and the Immune System. *Science*. 2001;291:2370-6.
82. Sajevic T, Leonardi A, Krizaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*. 2011 Apr;57(5):627-45.
83. Sanchez EF, Schneider FS, Yarleque A, Borges MH, Richardson M, Figueiredo SG *et al*. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both in blood vessel ECM and platelets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010;496:9-20.
84. Schwarz F, Aebi M. Mechanisms and Principles of N-linked Protein Glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*. 2011;21:576-82.
85. Selman MHJ, Hoffmann M, Zauner G, McDonnell LA, Balog CIA, Rapp E *et al*. MALDI-TOF-MS analysis of sialylated glycans and glycopeptides using 4-chloro-4-cyanocinnamic acid matrix. *Proteomics*. 2012;12:1337-48.

86. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996 Mar 1;68(5):850-8.
87. Silva AST, Marcelino JR, Tenório ECN, Sakauchi MA, Gattás V. *Soros e Vacinas.* 2 ed. São Paulo: Instituto Butantan; 2013.
88. Skropeta D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. *Biorganic & Medicinal Chemistry.* 2009;17:2645-53.
89. Sørensen ALT, Clausen H, Wandall HH. Carbohydrate clearance receptors in transfusion medicine. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012;1820:1797-808.
90. Spiro RG. Protein Glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 2002;12(4):43R-56R.
91. Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editors. *Essentials of Glycobiology - Second Edition.* New York: Cold Spring Harbor; 2009.
92. Swenson SD, Markland Jr FS. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon.* 2005;45(8):1021-39.
93. Tanjoni I, Weinlich R, Della-Casa MS, Clissa PB, Saldanha-Gama RF, de Freitas MS *et al.* Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. *Apoptosis.* 2005;10(1):851-61.
94. Theakston RDG. An objective approach to antivenom therapy and assessment of first-aid measures in snake bite. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* 1997;91(7):857-65.

95. Tretter V, Altmann F, Marz L. Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1----3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur J Biochem.* 1991 Aug 1;199(3):647-52.
96. Valente RH, Dragulev B, Perales J, Fox JW, Domont GB. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *Eur J Biochem.* 2001 May;268(10):3042-52.
97. Valente RH, Neves-Ferreira AGC, Caffarena ER, Domont GB, Perales J. Snake Venom Metalloproteinase Inhibitors - An Overview And Future Perspectives. In: Lima ME, editor. *Animal Toxins - State of the Art Perspectives in Health and Biotechnology.* Belo Horizonte: Editora UFMG; 2009. p. 547-58.
98. Voss RS, Jansa SA. Snake-venom resistance as a mammalian trophic adaptation: lessons from didelphid marsupials. *Biological Reviews.* 2012;87(4):822-37.
99. Wada Y, Azadi P, Costello CE, Dell A, Dwek RA, Geyer H *et al.* Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans - HUPO Glycomics / Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycobiology.* 2007;17(4):411-22.
100. Warrell DA. Snake bite. *The Lancet.* 2010;375:77-88.
101. Wen FH, Malaque CMS. *Animals Envenomations in Brazil.* 1 ed. São Paulo: Instituto Butantan; 2013.
102. Wheeler SF, Domann P, Harvey DJ. Derivatization of sialic acids for stabilization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of a(2-3)- and a(2-6)-isomers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2009;23(1):303-12.
103. White J. Snake Venoms and Coagulopathy. *Toxicon.* 2005;45(1):951-67.

104. Williams D, Gutierrez JM, Harrison RA, Warrell DA, White J, Winkel K *et al.* The Global Snakebite Initiative: An antidote to snakebite. *The Lancet*. 2010;375:89-91.
105. Yamakawa Y, Omori-Satoh T. Primary Structure of the Antihemorrhagic Factor in Serum of Japanese Habu: A Snake Venom Metalloproteinase Inhibitor with a Double-Headed Cystatin Domain. *JBiochem*. 1992;112:583-9.
106. Yu YQ, Gilar M, Kaska J, Gebler JC. A rapid sample preparation method for mass spectrometric characterization of N-linked glycans. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005;19(1):2331-6.
107. Zielinska DF, Gnad F, Wisniewski JR, Mann M. Precision Mapping of an In Vivo N-glycoproteome Reveals Rigid Topological and Sequence Constraints. *Cell* 2010;141(5):897-907.

8 - ANEXOS

Abordagens anteriores de desglicosilação de BJ46a com a enzima PNGase F em condições desnaturantes e redutoras.

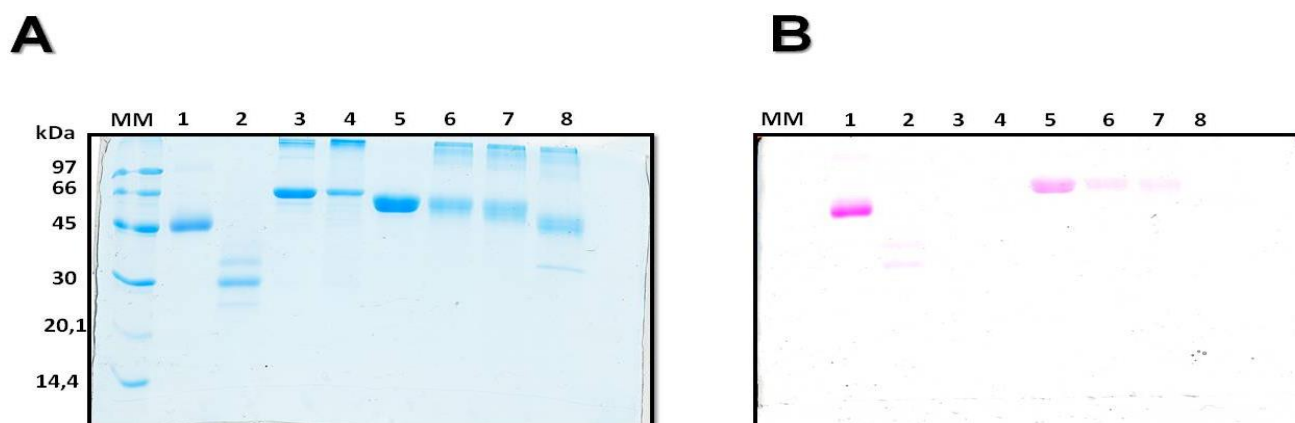


Figura 30: Desglicosilação de α -1 glicoproteína ácida, BSA e BJ46a em condições desnaturantes e redutoras (SDS / DTT).

Painel A: Análise da desglicosilação de α -1 glicoproteína ácida, BSA e BJ46a por SDS-PAGE. Raia 1: α 1-glicoproteína ácida humana controle (4 μ g); 2: α 1-glicoproteína ácida humana + 0,08U PNGaseF; 3: BSA controle (4 μ g); 4: BSA + 0,08U PNGase F; 5: BJ46a controle (4 μ g); 6: BJ46a + 0,08U PNGase F; 7: BJ46a + 0,2U PNGase F; 8: BJ46a + 4U PNGase F; MM: marcador de massa molecular. Corado por Coomassie G-250.

Painel B: Gel corado por ácido periódico / reagente de Schiff

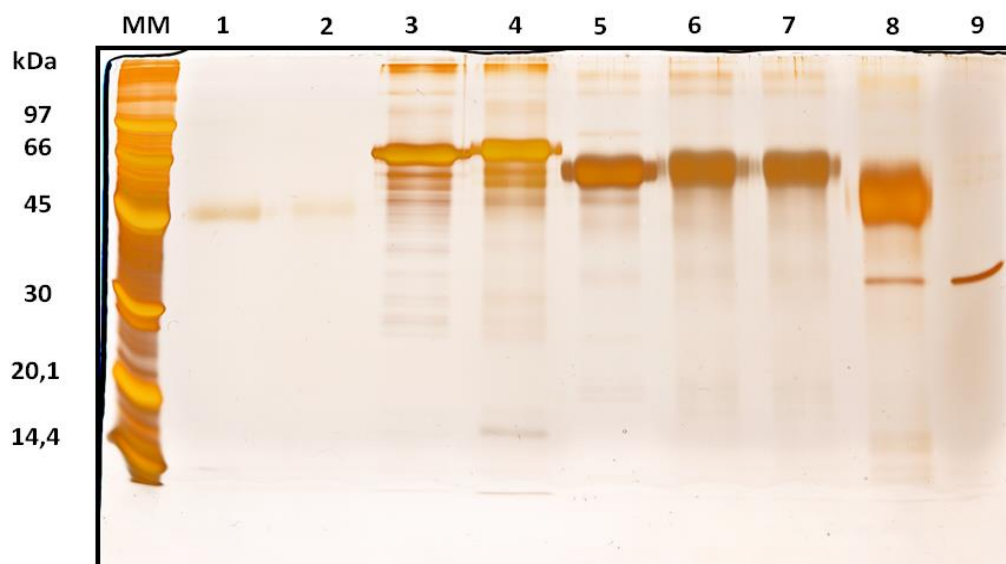


Figura 31: Desglicosilação de α -1 glicoproteína ácida, BSA e BJ46a em condições desnaturantes (Uréia 8M) após redução e alquilação das cisteínas com DTT / iodoacetamida.

Painel A: Análise da desglicosilação por SDS-PAGE. Raia 1: α 1-glicoproteína ácida humana controle (1 μ g); 2: α 1-glicoproteína ácida humana + 0,05U PNGaseF; 3: BSA controle (1 μ g); 4: BSA + 0,05U PNGaseF; 5: BJ46a controle (1 μ g); 6: BJ46a + 0,05U PNGaseF; 7: BJ46a + 0,1U PNGaseF; 8: BJ46a + 1U PNGaseF; 9: PNGase F controle (1U). MM: marcador de massa molecular. Corado por impregnação por prata.