



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

*Caracterização estrutural e funcional de metaloproteases isoladas de  
peçonhas botrópicas*

*Aluno: Mário Sérgio Rocha Gomes*

*Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Veridiana De Melo Rodrigues Ávila*

UBERLÂNDIA – MG

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

*Caracterização estrutural e funcional de metaloproteases isoladas de  
peçonhas botrópicas*

*Aluno: Mário Sérgio Rocha Gomes*

*Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Veridiana De Melo Rodrigues Ávila*

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como parte  
dos requisitos para obtenção do  
Título de Doutor em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA – MG

2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.**

---

- G633c Gomes, Mário Sérgio Rocha, 1968-
- 2013 Caracterização estrutural e funcional de metaloproteases isoladas de peçonhas botrópicas /Mário Sérgio Rocha Gomes. -- 2013.  
127f. : il.
- Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.
1. 1. Bioquímica - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses.
2. 3. Bothrops - Teses. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.
- 3.
- 

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

*Caracterização estrutural e funcional de metaloproteases isoladas de  
peçonhas bothrópicas*

*Aluno: Mário Sérgio Rocha Gomes*

Presidente: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Dr<sup>a</sup> Renata Santos Rodrigues

Dr Fábio de Oliveira

Dr<sup>a</sup> Juliana Izabel dos Santos

Dr<sup>a</sup> Patrícia Bianca Clissa

Data da Defesa 22/03/2013.

As sugestões da comissão examinadora e as normas do PGGB para o formato da tese foram contempladas.

Veridiana M. Ávila  
Assinatura do Orientador

## DEDICATÓRIA

- ✓ *Às mulheres da minha vida: Minha esposa Rosely e minhas filhas Ana Karolina e Gabriela.*
  
- ✓ *Ao DEUS da Misericórdia, Deus de Abraão, Israel, Jacó e que também é o meu DEUS. Ao Nossa Senhor Jesus Cristo, o cordeiro de DEUS e a Maria Santíssima Intercessora e Advogada Nossa.*

*Magnificat (Lc 1, 46-56)*

*Minha alma glorifica o Senhor,*

*Meu espírito exulta de alegria em DEUS, meu salvador.*

*Porque olhou para sua pobre serva*

*Por isto, desde agora, me proclamarão bem-aventurada todas as gerações.*

*Porque realizou em mim maravilhas aquele que é poderoso*

*e cujo nome é Santo*

*Sua misericórdia se estende de geração em geração, sobre os que o temem.*

*Manifestou o poder de seu braço,*

*Desconcertou os corações dos soberbos.*

*Derrubou do trono os poderosos e exaltou os humildes.*

*Saciou de bens os indigentes e despediu de mãos vazias os ricos.*

*Acolheu a Israel, seu servo, lembrando-se da sua misericórdia.*

*Conforme prometera a nossos pais,*

*Em favor de Abraão e sua prosperidade para sempre.*

## AGRADECIMENTOS

- ✓ A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Veridiana de Melo Rodrigues Ávila por ter me dado à oportunidade de desenvolver este trabalho e não só pelos ensinamentos acadêmicos, mas pelo constante aprendizado pessoal.
- ✓ Ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira pelo apoio e por disponibilizar as portas do seu laboratório sempre abertas para mim.
- ✓ A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana S. de Castro (UÑB) e as doutorandas Jessica K. Macedo e Elaine M. Aquino, pela calorosa receptividade e pela disponibilidade na realização dos experimentos de espectrometria de massa.
- ✓ A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata S. Rodrigues pela importante colaboração na busca dos fragmentos na biblioteca de *Bothrops pauloensis*.
- ✓ A Dr<sup>a</sup> Daiana S. Lopes pela importante colaboração na elaboração e correção deste trabalho. Assim como pelo constante carinho e amizade.
- ✓ A Dr<sup>a</sup> Márcia H. Borges pela realização dos experimentos de espectrometria de massa.
- ✓ A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelly Yoneyama pela convivência e colaboração no nosso laboratório.
- ✓ Aos colegas do LQPPN-UFGV em especial a Dayane Lorena e Dr<sup>a</sup> Daiana Lopes pela imensa colaboração nos experimentos e pela companhia sempre agradável.
- ✓ Aos colegas do Lab. De Biofísica-UFGV, em especial a Carla Mamede e a Mayara pelo constante apoio e amizade.

- ✓ *A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Inês por ter me iniciado nesta deslumbrante carreira científica das toxinas de peçonha.*
- ✓ *A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi pelo apoio não somente no laboratório, mas também pessoal.*
- ✓ *Aos amigos funcionários do INGEB em especial a Tianinha que sempre presente me incentivou, colaborou e me acolheu de forma calorosa e amiga.*
- ✓ *A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB pelo importante apoio.*

*Este Trabalho Foi  
Desenvolvido no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais  
(LQPPN) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – campus Umuarama, sob a  
orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e contou com a colaboração dos  
Laboratórios de Biofísica (UFU), Laboratório de Toxicologia (UNB) e da Fundação  
Ezequiel Dias (BH-MG).*

# Sumário

Dedicatória	iv
Agradecimentos	vi
Lista de figuras e tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Apresentação	1
Capítulo I – Fundamentação teórica	5
Serpentes: Aspectos evolutivos, classificação e epidemiologia	6
Composição das peçonhas das serpentes	9
Metaloproteases	12
Metaloproteases de peçonhas de serpentes	16
Mecanismo de ação das SVMPs	20
<i>Bothrops pauloensis</i> e <i>Bothrops leucurus</i>	25
Referências bibliográficas	30
Capítulo II – Caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease hemorrágica isolada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>	38
Resumo	39
Abstract	40
Introdução	41
Materiais e métodos	44
Resultados e discussão	57
Referências bibliográficas	69
Figuras e legendas	77

Capítulo III – Purificação e caracterização funcional de uma nova metaloprotease ( <i>BleucMP</i> ) da peçonha de <i>Bothrops leucurus</i> . Artigo publicado na revista Comparative Biochemistry and Physiology part C.	94
Resumo	95
Abstract	96
Introduction	97
Materials and methods	99
Results and discussion	105
References	111
Legends for figures	116

## **Figuras e Tabela**

### CAPÍTULO I

**Figura 1:** Hidra de Lerna, o segundo dos doze trabalhos de Hercules e imagem da Bíblia sagrada.

**Figura 2:** Representação do processo evolutivo da dentição das serpentes.

**Figura 3:** Representação simplificada da coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária.

**Figura 4:** Níveis de hierarquia das metaloproteases.

**Figura 5:** Estrutura esquemática do sítio catalítico das metaloproteases.

**Figura 6:** Reclassificação das SVMPs com base em estudo de transcriptoma e de estrutura de SVMPs já elucidadas.

**Figura 7:** Representação em % das substâncias expressas na glândula de peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*.

**Tabela 1:** Lista de toxinas purificadas das peçonhas das serpentes *Bothrops pauloensis* e *Bothrops leucurus*.

### CAPÍTULO II

**Figura 1:** Etapas do processo de purificação da metaloprotease *Botropoidina* da peçonha de *Bothrops pauloensis*.

**Figura 2:** PAGE-SDS, Perfil em RP-HPLC, pI e MALDI TOF/MS da metaloprotease Bothropoidin.

**Figura 3:** Espectros obtidos por espectrometria de massa (MALDI TOF).

**Figura 4:** Alinhamento da sequência parcial peptídica da *Botropoidina*.

**Figura 5:** Atividade Azocaseinolítica.

**Figura 6:** Estabilidade enzimática frente a variação de pH e temperatura.

**Figura 7:** Degradação de fibrinogênio e fibrina.

**Figura 8:** Atividade hemorrágica.

**Figura 9:** Degradação de colágeno tipo-IV e fibronectina.

**Figura 10:** Agregação plaquetária.

**Figura 11:** Cortes histopatológicos de músculo gastrocnêmios.

**Figura 12:** Níveis plasmáticos da enzima creatina cinase (C.K.)

**Figura 13:** Viabilidade e adesão celular.

**Figura 14:** Fotomicrografia com contraste de fase de cultura de células tEnd tratadas com a toxina *Botropoidina*.

**Tabela 1:** Rendimento protéico e recuperação da atividade azocaseinolítica

## **Lista de Abreviaturas**

Abs: Absorbância.

ACN: Acetonitrila.

ADAMs: A Disintegrin And Metalloprotease.

ADAMTs: *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs.*

ADP: Adenosina difosfato.

AMBIC: Bicarbonato de amônio.

BLAST: *Basic local alignment and search tool.*

BSA: Bovine serum albumine.

CK: Creatina kinase.

D/C: domínio desintegrina-like e rico em cisteína.

DTT: Ditiotreitol.

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.

HCCA: Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico.

HEPES: N-2-hydroxyethylpiperazine-N-1-2-ethanesulfonic acid.

i.d.: intradérmica.

i.m.: intramuscular.

i.p. : intraperitoneal.

kDa: Quilo Dálton.

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Fligh.

MB: Membrana Basal.

MS: Mass spectrometry.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.

NCBI: Centro Nacional de Informação Biotecnológica.

PBS: Phosphate buffered saline.

PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>.

PMF: Peptide Fragment Fingerprint.

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonila.

PPP: Plasma pobre em plaquetas.

PRP: Plasma rico em plaquetas.

RP-HPLC: Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography.

SBH: Sociedade Brasileira de Herpetologia.

SDS: Sodium dodecyl sulfate.

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

SVMP: Metaloproteases de peçonha de serpentes (*Snake Venom Metaloproteinase*).

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletileno-diamino.

TFA: Ácido trifluoroacético.

Tris: Hodroximetil-aminometano.

---

## *Apresentação*

---

As serpentes sempre exerceram no ser humano um fascínio que transcende da cultura popular às bancadas acadêmicas. Estudos sobre a composição e caracterização funcional das substâncias que compõem as peçonhas secretadas pelas serpentes destacam-se entre os mais citados em revistas na área de Toxinologia. Isso porque essas peçonhas constituem um verdadeiro arsenal bioquímico de proteínas e peptídeos biologicamente ativos que despertam interesse tanto no que diz respeito ao conhecimento da sua participação na fisiopatologia do envenenamento, bem como em uma possível aplicação terapêutica para alguns de seus componentes isolados.

As peçonhas das serpentes são provavelmente, as mais complexas de todas as peçonhas animais conhecidas, contendo 20 ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do seu peso seco corresponde a proteínas.

As peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* (Família viperidae) possuem toxinas enzimáticas (metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidase, fosfodiesterases, colinesterases, hialuronidases, ATPases, NAD nucleosidases, catalases, aminotransferases e β-glucosaminidases) e as toxinas não enzimáticas (cardiotoxinas, citotoxinas, fatores de crescimento vascular e neural, lectinas tipo-C, inibidores e peptídeos desintegrinas). Essa gama de componentes atua sobre os sistemas da vítima, produzindo dano tecidual local que incluem sintomas como dor, edema, necrose, e distúrbios sistêmicos como coagulopatias, hemorragia e falência renal. Pesquisadores sugerem que esses processos são parte de uma estratégia que as serpentes utilizam para imobilizar as presas, no entanto, toxinas provavelmente também contribuem para aumentar a permeabilidade do tecido alvo para outros componentes da peçonha.

Entre os constituintes biologicamente ativos destacam-se as metaloproteases denominadas na literatura de Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs). Essas enzimas apresentam dependência de íons metálicos como o zinco para exercerem a sua atividade catalítica. Apresentam uma diversidade estrutural a qual confere às mesmas a capacidade de interferir em diversos sistemas celulares, afetando a hemostasia de diferentes maneiras. De modo geral, o mecanismo de ação das SVMPs está relacionado à proteólise de

componentes da matriz extracelular, proteínas plasmáticas, proteínas de membrana celular e à interação com receptores específicos, como integrinas de superfície de plaquetas, células endoteliais e fibroblastos, ativando ou inibindo a resposta celular. Esses efeitos podem resultar em várias alterações fisiopatológicas tais como inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e hemorragia.

No presente trabalho são demonstrados os processos de purificação e caracterização bioquímica e funcional de duas SVMPs provenientes das peçonhas das serpentes *Bothrops pauloensis* e *Bothrops leucurus*.

O capítulo I consiste em uma fundamentação teórica sobre a composição das peçonhas das serpentes, suas ações biológicas e o mecanismo de ação das SVMPs na fisiopatologia do envenenamento.

O capítulo II apresenta o isolamento e caracterização bioquímica e funcional de uma SVMP denominada *Botropoidina*; uma metaloprotease hemorrágica da classe P-III proveniente da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Esta enzima apresentou atividade proteolítica sobre as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio, azocaseína e fibrina. Foi capaz de tornar o sangue de camundongos incoagulável e apresentou uma alta atividade hemorrágica quando inoculada em baixas doses. Esta enzima ácida, também foi capaz de degradar colágeno tipo IV, fibronectina, inibir fortemente a agregação plaquetária principalmente induzida pelo colágeno e interferir na viabilidade e adesão celular em cultura de células endoteliais. *Botropoidina* demonstrou ser um dos principais componentes da peçonha de *Bothrops pauloensis* responsáveis pelos danos tanto locais, quanto sistêmicos causados no envenenamento por este tipo de serpente.

No capítulo III são apresentados os resultados de isolamento, caracterização bioquímica e funcional de outra metaloprotease denominada *BleucMP*. Uma SVMP não hemorrágica da classe P-I proveniente da peçonha de *Bothrops leucurus*. Esta enzima também demonstrou uma forte atividade proteolítica, sendo capaz de degradar tanto a cadeia A $\alpha$  quanto B $\beta$  do fibrinogênio. Apresentou eficiência sobre substratos como azocaseína e fibrina, causou incoaguabilidade sanguínea, mostrando assim uma ação direta na cascata de coagulação. No entanto, não foi capaz de induzir a hemorragia mesmo

em doses elevadas e, apesar de apresentar uma ação edematogênica e inflamatória, revelou ser pouco tóxica, mesmo com doses mais elevadas, nos resultados dos testes tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Os dados apresentados neste trabalho nos levam a confrontar a atividade das SVMPs das classes P-I e P-III, revelando a participação direta destas enzimas nos danos causados por envenenamento ofídicos e revelando que o quadro geral do envenenamento é uma consequência da ação sinérgica dos diversos componentes que são inoculados quando da ocorrência do acidente ofídico.

Todos os capítulos deste trabalho foram redigidos de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Anexo I).

---

*Capítulo I*

*Fundamentação Teórica*

---

## ***1-Serpentes: Aspectos evolutivos, classificação e epidemiologia***

Desde os primórdios que as serpentes têm exercido no homem um fascínio que transcende da mitologia e cultura popular (contos e crenças) às pesquisas científicas. Estes estudos, há várias décadas, têm demonstrado a relação estrutura e função de seus componentes, principalmente no entendimento de suas ações no envenenamento e de suas aplicações nas áreas clínica e biotecnológica (RAMOS & SELISTE-DE-ARAUJO, 2006).

As serpentes são símbolos em diversos eventos e fatos ao longo dos milhares de anos. Por exemplo, na religião, em que a serpente induz os primeiros humanos a provarem do fruto da sabedoria no jardim do Éden e assim poderiam ser iguais a Deus (O Criador). Ou na simbologia, quando Deus pede para que Moisés faça e pregue num cajado a imagem de uma serpente e todos àqueles que olhassem para a serpente suspensa no cajado ficariam curados. Supõe-se que esta serpente do cajado faz alusão à crucificação do Cristo.

Na mitologia grega, a serpente também é um símbolo como demonstrado no segundo trabalho realizado por Hércules retratado como “O combate com a Hidra de Lerna”. A Hidra de Lerna era um animal fantástico da mitologia grega, com corpo de dragão e sete cabeças de serpente (Figura 1). Segundo o conto mitológico, esta serpente era tão venenosa que era capaz de matar o homem apenas com o seu hálito. Após vencer a batalha contra este mito, Hércules banhou as suas lanças no sangue das serpentes para tomar posse do poderoso veneno e assim continuar as suas batalhas. Para a maioria dos povos (do ocidente ao oriente), as serpentes desempenham um papel multiforme de simbologia, sendo o elo entre o bem e o mal, aquele que pode curar ou matar (símbolo proposto pela medicina), animal frio, astuto, que anda rastejando sobre a terra e que possui um potente veneno (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Serpente>).



**Figura 1- Hidra de Lerna. O segundo trabalho realizado por Hércules e imagem da Bíblia Sagrada.**

Fonte: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Serpente\\_\(simbologia\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Serpente_(simbologia)), acessado em 10/10/2012.

Cientificamente existem algumas teorias sobre a origem das serpentes, indicando que estas surgiram no período cretáceo há cerca de 135 milhões de anos e demonstram ter uma ancestralidade com os lagartos varanídeos extintos; Eram aquáticas e viviam em ambiente marinho. No entanto, ainda há contradição quanto à verdadeira ancestralidade das serpentes. Atualmente elas são agrupadas junto com os lagartos na ordem Squamata, que compõe a classe dos répteis (KOCHEVA, 1986; COATES & RUTA, 2000; CARDOSO et al., 2003). No mundo existem aproximadamente 3000 espécies de serpentes catalogadas, sendo que destas cerca de 20% são peçonhentas e estão distribuídas em diferentes famílias (SAJEVIC et al., 2011).

As serpentes peçonhentas de ocorrência na fauna brasileira estão distribuídas nas famílias Viperidae e Elapidae. Estas famílias são formadas pelos gêneros *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. Com base na reclassificação recente proposta pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (BÉRNIA & COSTA, 2012), as serpentes peçonhentas brasileiras pertencentes

ao gênero *Bothrops* compreendem aproximadamente 30 espécies distribuídas em todo território nacional. Habitam geralmente locais úmidos, podendo ser encontradas em zonas rurais e periferias de grandes cidades. Possuem hábitos noturnos e a maioria é terrícola; São conhecidas comumente por: jararaca, jararacuçu, urutu, cotiara, boca-de-sapo entre outros. As principais serpentes do gênero *Bothrops* de ocorrência no Brasil são *Bothrops atrox*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops pirajai*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus* (CARDOSO et al., 2003, VALLE & BRITTES, 2008, BÉRNILS & COSTA, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde o envenenamento ofídico é um problema de saúde pública sendo considerado como uma das doenças negligenciadas. Anualmente são registrados mais de 2,5 milhões de acidentes ofídicos com serpentes em todo o mundo. Destes, cerca de 100.000 resultam em casos fatais (CHIPPAUX, 1998; KASTURIRATNE, 2008).

Dados obtidos no site do Ministério da Saúde relatam que em 2011 foram notificados 30.836 casos de acidentes ofídicos em todo o território brasileiro. Sendo que 88% foram atribuídos ao gênero *Bothrops*, enquanto que os acidentes crotálicos, laquéticos e elapídicos correspondem a, respectivamente, 9%, 2,5% e 0,5% do total notificado (Ministério da Saúde).

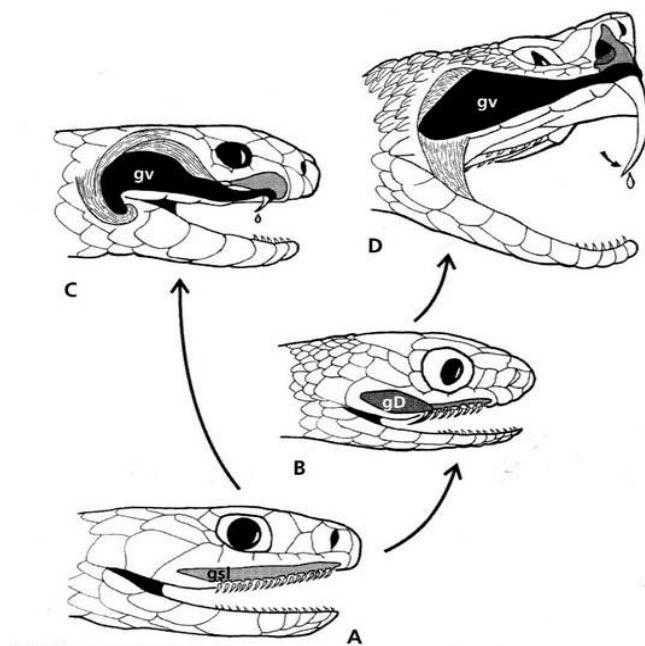
O número de casos de ofidismo no Brasil varia de acordo com a região (mais elevados nas regiões norte e nordeste) e com as épocas do ano, aumentando o número de acidentes no período das chuvas e de altas temperaturas, coincidindo com o período de maior atividade humana no campo. Os acidentes acometem com maior frequência adultos e jovens do sexo masculino. Nas regiões Sul e Sudeste, os acidentes ocorrem em maior quantidade no período de janeiro a abril. Já nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, esta variação não é tão evidente (CARDOSO et al., 2003).

## **2-Composição das Peçonhas das Serpentes**

Serpentes peçonhentas são aquelas que produzem peçonha em glândulas e possuem um aparelho especializado para a inoculação desta substância. A glândula responsável pela produção da peçonha das serpentes certamente evoluiu de outras glândulas salivar da família dos répteis. Estas glândulas produzem uma secreção salivar que auxilia no processo de lubrificação e digestão dos alimentos (Figura 2). Assim as serpentes são classificadas de acordo com o tipo de dentição como: *Áglifa*, *Opistóglifa*, *Proteróglifa*, *Solenóglifa*.

- *Áglifa*: Dentição característica das serpentes sem aparelho inoculador de peçonha. A glândula supralabial produz uma secreção destinada a lubrificar o alimento. Estas serpentes atacam geralmente, por constrição.
- *Opistóglifa*: Dentição característica de determinadas espécies de serpentes, cujos dentes inoculadores de peçonha se encontram na parte posterior do maxilar superior, apresentando, assim, perigo reduzido para o homem. Dentição característica de alguns membros da família Colubridae como a falsa-coral. A glândula de Duvernoy presente nestas serpentes produzem substâncias destinadas à digestão.
- *Proteróglifa*: Dentição característica das serpentes da família Elapidae. Apresentam dois dentes inoculadores de peçonha na parte anterior do maxilar superior, de caráter marcadamente forte e que estão conectados com a glândula venenífera. Como exemplo podemos citar as corais verdadeiras (*Micrurus*).
- *Solenóglifa*: Dentição característica das serpentes da família Viperidae. Os membros desta família possuem dois dentes extremamente grandes que se projetam para fora no momento de inoculação da peçonha. Esta dentição é caracterizada por ser forte e está ligada diretamente com a glândula venenífera. Tais características são atribuídas ao processo evolutivo das serpentes e fazem com que as serpentes que apresentam este tipo de dentição

adquiram maior eficácia na inoculação da sua peçonha nas presas. (KOVACH, 1986; CARDOSO et al., 2003).



**Figura 2: Representação do processo evolutivo da dentição das serpentes.**  
**(A) Dentição Áglifa, (B) Dentição Opistóglifa, (C) Dentição Proteróglifa, (D)**  
**Dentição Solenóglifa. (gsl) = glândula supralabial; (gD)= glândula de**  
**Duvernoy; (gv)= Glândula venenífera.** (Fonte: CARDOSO et al., 2003).

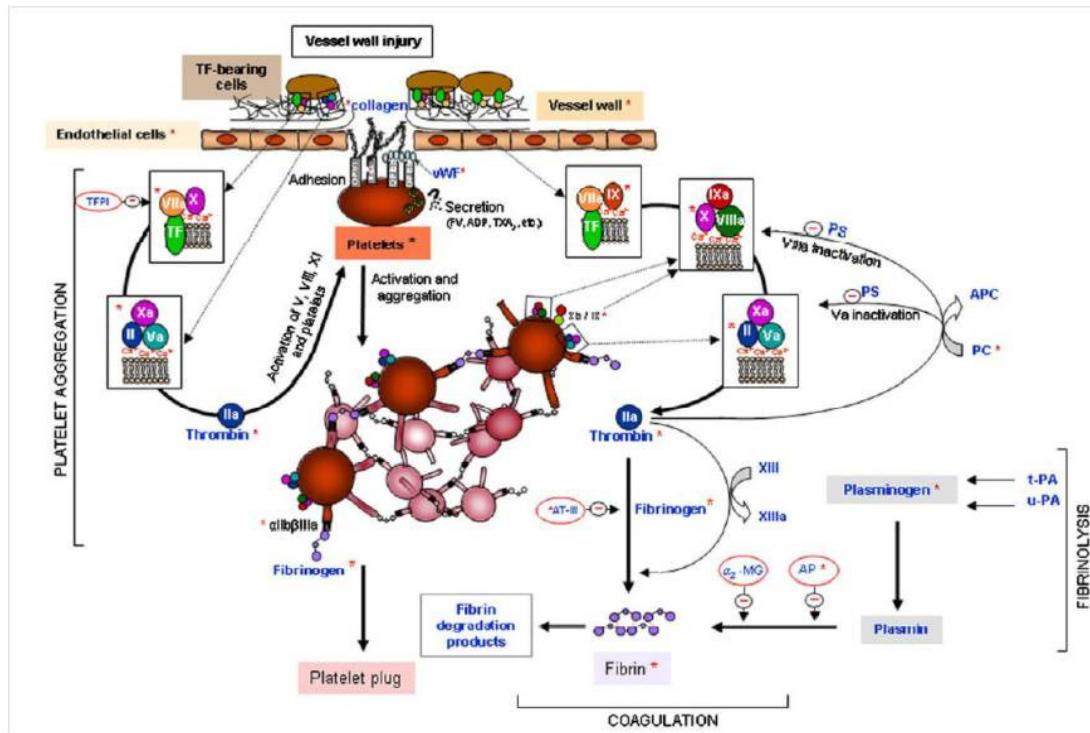
Ao longo do processo evolutivo, as glândulas que eram responsáveis pela produção de uma secreção composta de substâncias digestivas foram acrescidas de outros componentes biologicamente ativos, tais como enzimas que interferem em vários eventos celulares, componentes não enzimáticos capazes de interferir na hemostasia e componentes não proteicos. Sendo assim, as peçonhas das serpentes que eram utilizadas para paralisar e digerir as presas, também passou a ter uma ação de defesa contra predadores.

As peçonhas de serpentes encontram-se entre os materiais biológicos de maior interesse científico, tendo em vista a sua imensa variabilidade de substâncias com alto potencial farmacológico. Na última década mais de 4.500

artigos relacionados ao referido assunto foram publicados em revistas especializadas em Toxinologia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Aproximadamente 90% do peso seco das peçonhas ofídicas é representado por proteínas com atividade enzimática (acetilcolinesterases, aminotrasferases, ADPases, ATPases, catalases, fosfolipases A<sub>2</sub>, hialuronidases, L-aminoácido oxidases, metaloproteases, serinoproteases); proteínas não enzimáticas (ativador de Proteína C, fatores de crescimento, inibidores do complexo protrombina, precursores de peptídeos bioativos, lectinas, inibidores enzimáticos e desintegrinas); além de componentes orgânicos de baixa massa molecular (carboidratos, nucleotídeos, aminas, lipídeos e aminoácidos livres) e componentes inorgânicos (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; KANG et al., 2011).

As serinoproteases e metaloproteases são as principais enzimas proteolíticas presentes nas peçonhas da família Viperidae. Análises de transcriptoma e proteômica têm demonstrado que estas proteases representam cerca de 40% da porção protéica enzimaticamente ativa. Estas enzimas têm como alvo preferencial o sistema hemostático humano e de muitos outros mamíferos; são capazes de estimular ou inibir o mecanismo hemostático, incluindo a cascata de coagulação sanguínea, fibrinólise, hipotensão, integridade vascular e função plaquetária. Dentre as principais ações dessas enzimas sobre o sistema hemostático, destacam-se principalmente a sua capacidade de degradar o fibrinogênio e fibrina (enzimas fibri(ogen)olíticas), ativar os fatores V, X, proteína C, antitrombina e plasminogênio, inibir ou ativar a agregação plaquetária, bem como apresentarem atividade semelhante a calicreína plasmática (Figura 3). Além disto, as metaloproteases são potentes enzimas que apresentam capacidade de degradar componentes da membrana basal (colágeno, fibronectina, laminina) e por consequência promover o extravasamento sanguíneo (hemorragia). Estas proteases são as principais responsáveis pelo sangramento tanto local quanto sistêmico causado pelo envenenamento ofídico (MARKLAND, 1998; WHITE, 2005; SELISTRE-DE-ARAUJO & FERREIRA DE SOUZA, 2007; BERGER et al., 2008; TASHIMA et al., 2008; TERRA et al., 2009; ESCALANTE et al., 2011; SAJEVIC et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012).



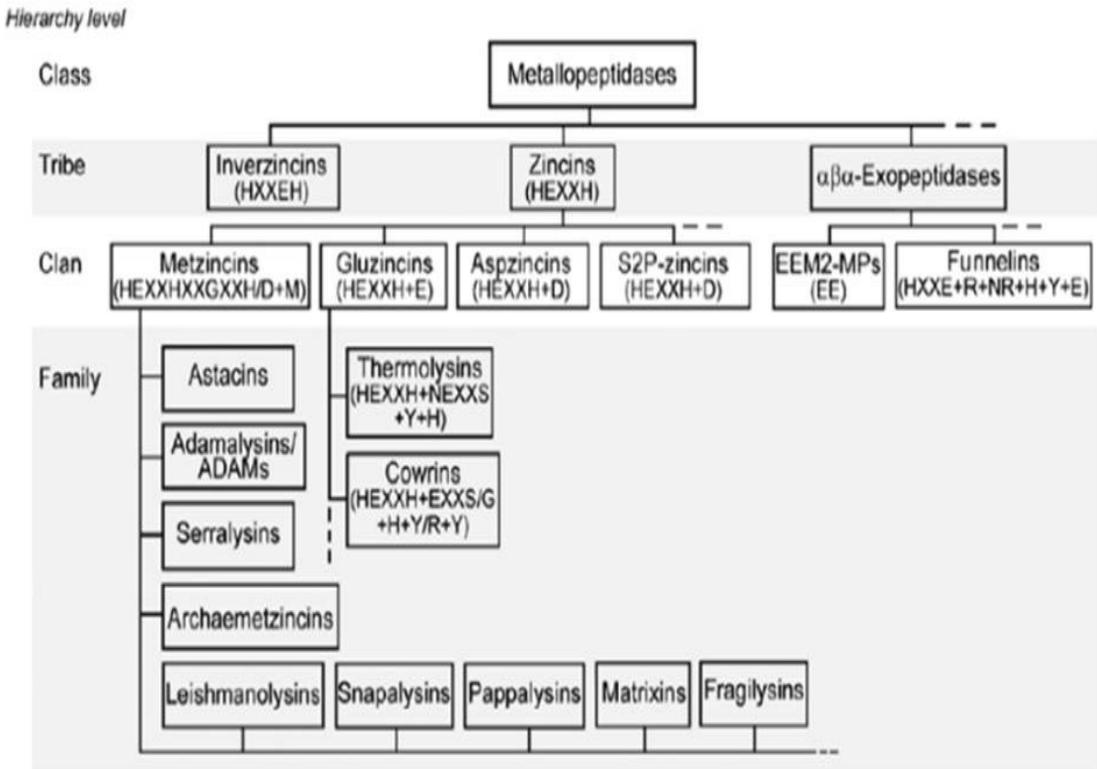
**Figura 3: Representação simplificada da cascata de coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária. Estes eventos constituem os principais focos de ação das enzimas proteolíticas serinoproteases e metaloproteases das peçonhas de serpentes.** (Fonte: SAJEVIC et al., 2011).

### *3-Metaloproteases*

Metaloproteases são enzimas hidrolíticas do tipo endopeptidases (E.C.3.4.24) que dependem da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico para manifestação de suas atividades. Estas enzimas ocorrem amplamente de bactérias até mamíferos e estão distribuídas em três níveis hierárquicos (Tribo, Clan e Famílias). Esta divisão é baseada em sequências consenso contendo resíduos de aminoácidos que participam em motivo de ligação do zinco, sítios de ligação do substrato, e ou motivos envolvidos na catálise (GOMIS-RÜTH et al., 2003, GOMIS-RÜTH et al., 2012).

As metaloproteases estão distribuídas em três tribos (Inverzincinas, Zincinas e  $\alpha\beta$ -exopeptidases). A tribo Zincina possui seis clans dentre os quais está o clan Metizincina que possui nove famílias (Astacinas, Serralisinas, Archaemetzincinas, Leishmanolisinas, Snapalisinas, Pappalisinas, Fragilisinas, Matrixinas e Adamalisinas). As adamalisinas incluem as metaloproteases de peçonhas de serpentes as SVMPs (SVMPs – Snake Venom Metalloproteinases), as metaloproteases ADAMs (ADAMs – A Disintegrin And Metalloproteinase) e ADAMTs (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*). As SVMPs, ADAMs e ADAMTs apresentam similaridade estrutural e formam a subfamília “Reprolynsins” (Figura 4) (BODE et al., 1993; FOX & SERRANO, 2005; RAMOS & SELISTE-DE-ARAUJO, 2006; GOMIS-RÜTH et al., 2003, GOMIS-RUTH et al., 2012; TAKEDA et al., 2012).

Estruturalmente as metaloproteases do Clan “Metzincina” são caracterizadas por apresentarem uma sequência consenso (HEBXHXBGBXH) com três resíduos de histidina (H) que estão ligados ao íon zinco ( $Zn^{++}$ ) e uma sequência (CIMXP) localizada abaixo do sítio catalítico denominada de “Met-turn”, contendo uma metionina (M) que forma uma base hidrofóbica sob o centro ativo da hélice e da cavidade de ligação do substrato. O glutamato (E) que se encontra inserido no sitio catalítico, no momento da catálise enzimática recebe o próton de hidrogênio da molécula de água ligada ao zinco, formando uma região polarizada e promovendo o ataque nucleofílico à ligação peptídica (Figura 5) (BODE et al., 1993; RAMOS & SELISTE-DE-ARAUJO, 2006; GOMIS-RÜTH et al., 2003, GOMIS-RÜTH et al., 2012). Como já comentado as metaloproteases dependem diretamente do íon zinco na estrutura do seu sítio catalítico para exercerem sua função enzimática, sendo assim, estas enzimas são diretamente inibidas por agentes quelantes.



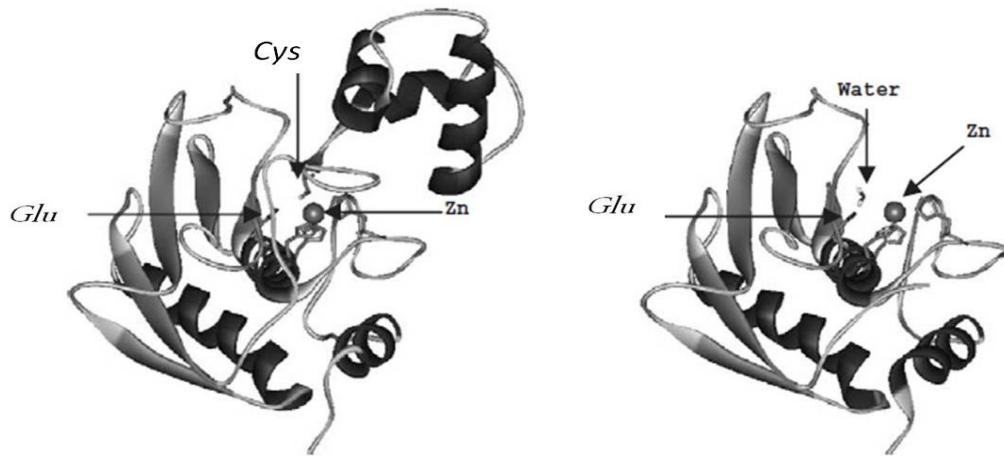
**Figura 4: Representação dos níveis de hierarquia das metaloproteases: Classe, Tribo, Clã e Família. Motivos de consenso (HEXXH) encontrado em todos os membros do clã “Metzincins”.** (Fonte: GOMIS-RÜTH et al., 2012).

As metaloproteases são secretadas como zimogênios e são ativadas geralmente por hidrólise de um pró-domínio através de um mecanismo conhecido como “cysteine-switch”. Neste mecanismo, o grupo tiol de um resíduo de cisteína presente numa sequencia altamente conservada (PKMCGVT), adjacente ao domínio protease, está coordenado ao íon zinco do sítio ativo, dessa forma bloqueando a função enzimática. O complexo simultaneamente bloqueia o sítio ativo e provavelmente exclui a água da esfera de coordenação do átomo de zinco. Todas as SVMPs ativas possuem uma molécula de água inserida no sitio catalítico que é essencial para a catálise.

O domínio catalítico da protease é representado pelo zinco catalítico ligado por três resíduos de histidina presentes na sequência de consenso

HEXXHXXGXXH formando um sítio ativo em hélice. A porção N-terminal da protease madura começa na alça à esquerda da molécula. No modelo de zimogênio a região N-terminal é alongada por um pró-peptídeo que possui a sequência PKMCGV, onde o grupo tiol de uma cisteína se liga ao zinco do sítio catalítico. A interrupção da interação cisteína-zinco causa ativação da molécula, mecanismo “cysteine-switch” (Figura 5).

A ativação fisiológica das metaloproteases é provavelmente iniciada por proteases que clivam sítios específicos dentro do pró-peptídeo, mas a ativação final das metaloproteases para a forma madura requer a retirada do pró-peptídeo inteiro por um mecanismo de autólise. Estas metaloproteases também podem ser ativadas por agentes oxidantes, surfactantes, metais pesados, entre outros, que modificam o resíduo de cisteína e dessa forma promovem a desestabilização da ligação do zinco com o grupo tiol da cisteína ativando a enzima (BODE et al., 1993; GRAMS et al., 1993; RAMOS & SELISTE-DE-ARAUJO, 2006).



**Figura 5: Estrutura tridimensional do sitio catalítico das metaloproteases do clan “Metzincin”. Representação da ligação da cisteína do pró-domínio metaloprotease com o íon zinco, impedindo a ligação com a molécula de água; Mecanismo *cysteine-switch*** (Fonte: RAMOS & SELISTE-DE-ARAUJO, 2006).

#### **4-Metaloproteases de peçonhas de serpentes**

As metaloproteases presentes nas peçonhas de serpentes (SVMPs) são sintetizadas na forma de pró-enzimas (zimogênios) contendo diferentes domínios estruturais e esses desempenham funções que as auxiliam no direcionamento, inativação e toxicidade (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; FOX & SERRANO, 2008). As SVMPs podem apresentar os seguintes domínios: peptídeo sinal, pró-domínio, domínio metaloprotease, interdomínio e dependendo da classe podem conter também domínios tipo desintegrina, rico em cisteína e domínio lectina.

O domínio peptídeo sinal é constituído por uma sequência com cerca de 20 resíduos de aminoácidos, na sua maioria são hidrofóbicos e tem como função direcionar a proteína para a localização celular ou ser secretada; o pró-domínio possui aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos e contém a sequência PKMCGVT, a qual se liga ao zinco catalítico e proporciona a inativação da enzima pelo mecanismo “*cysteine-switch*”. O domínio metaloprotease apresenta uma sequência de 200 a 210 resíduos de aminoácidos. Nesse domínio está presente o motivo ligante de zinco (HEXXHXXGXXH) e a sequência (CIMXP) onde se encontra um resíduo de metionina Met (*met-turn*) que provavelmente seja responsável por manter a estabilidade da estrutura para favorecer a ligação do zinco (Figura 5) (FOX & SERRANO, 2005; RAMOS & SELISTRE, 2006).

O domínio catalítico das SVMPs apresenta duas sequências consenso ( $H_{142}E_{143}XXH_{146}XXG_{149}XXH_{152}$  e  $A_{95}Q_{96}L_{97}L_{98}T_{99}$ ), bem como resíduos de cisteínas conservados Cys (117, 157, 159, 164, 181) os quais podem estar envolvidos em ligações dissulfeto (WATANABE et al., 2003; AKAO et al., 2010). Topologicamente, o domínio catalítico das SVMPs são classificados como proteínas  $\alpha/\beta$  com aparência de um “*open-sandwich*”, sendo a estrutura terciária composta por um subdomínio maior (N-terminal) o qual possui 4  $\alpha$ -hélices e 5 folhas  $\beta$  e um subdomínio menor (C-terminal) o qual é formado por uma única  $\alpha$ -hélice e vários *loops*. Estes subdomínios são separados por um canal hidrofóbico onde se localiza o sítio ativo e são unidos por duas ou três pontes dissulfeto (GOMIS-RÜTH et al., 1994; WATANABE et al. 2003).

Estudos estruturais demonstram que a catálise enzimática das SVMPs requer a presença de uma molécula de água localizada entre o grupo carboxílico do Glu catalítico e o íon zinco provocando um aumento da polarização na região do sítio catalítico, isto possibilita a transferência de um próton da molécula de água para o Glu, a qual se torna um nucleófilo e ataca o grupo carbonil da ligação peptídica do substrato levando o íon zinco a um estado de transição penta-coordenado. Com a transferência do próton do Glu para o nitrogênio da ligação peptídica do substrato, o mesmo é clivado liberando os subprodutos da reação, a enzima é regenerada com a incorporação de uma nova molécula de água (STOCKER et al., 1995; RAMOS & SELISTRE, 2006).

O interdomínio presente nas SVMPs é um segmento com 13-15 resíduos de aminoácidos que se encontra entre os domínios metaloprotease, desintegrina e tipo desintegrina. Em algumas SVMPs esse segmento apresenta um resíduo de cisteína que participa da formação de uma ponte dissulfeto com o domínio adjacente (ex.: *Bitistatina -1*; *Catrococolastatina-C*) (FOX & SERRANO, 2005; RAMOS & SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006). Estudos com peptídeo sintético correspondente ao segmento mostraram que esse interdomínio não contribui para a toxicidade da peçonha (KINI et al., 1997).

Os domínios desintegrina e rico em cisteína são responsáveis pelos mecanismos anti-adesivos das SVMPs e parecem ter a função de direcionar as proteínas para o seu alvo celular e plasmático. O domínio desintegrina apresenta entre 41 a 100 resíduos de aminoácidos e apresenta a tríade de aminoácido RGD (Arg-Gly-Asp) a qual lhe confere capacidade de interagir com integrinas na superfície das plaquetas, principalmente com a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  que é o receptor de fibrinogênio, e portanto, este domínio interfere na agregação plaquetária e adesão celular. Encontramos também uma tríade denominada desintegrina similar (*desintegrin-like - XCD*) podendo ser do tipo DCD (Asp-Cys-Asp) ou ECD (Glu-Cys-Asp) (CALVETE et al., 2005). O domínio rico em cisteína apresenta aproximadamente 112 resíduos de aminoácidos com um grande número de resíduos de cisteínas.

Algumas SVMPs apresentam o domínio lectina tipo C, homólogo às lectinas que são proteínas que se ligam a açúcares e, em específico nas

peçonhas de serpentes, apresenta a capacidade de afetar as funções plaquetárias (WIJEYEWICKREMA et al., 2005; FOX & SERRANO, 2005; RAMOS & SELISTE-DE-ARAUJO, 2006; TAKEDA et al., 2012).

As SVMPs foram agrupadas inicialmente em classes denominadas P-I, P-II, P-III e P-IV de acordo a sua composição estrutural (BJARNASON & FOX, 1994). Na classe P-I encontram-se as metaloproteases de baixa massa molecular (20-30 kDa), contendo apenas o domínio metaloprotease na sua forma ativa. Estas podem ser classificadas também como não hemorrágicas ou fracamente hemorrágicas. Na classe P-II as metaloproteases apresentam uma massa intermediária entre 30-35 kDa e são compostas pelos domínios metaloprotease e domínio desintegrina. A classe P-III compreende as chamadas hemorraginas com massa molecular elevada (acima de 40kDa) e que apresentam alta atividade hemorrágica. Estas enzimas são formadas pelos domínios: metaloprotease, tipo desintegrina e rico em cisteína. Por último, a antiga classe P-IV que contém todos os domínios da classe P-III e em adição o domínio lectina tipo C.

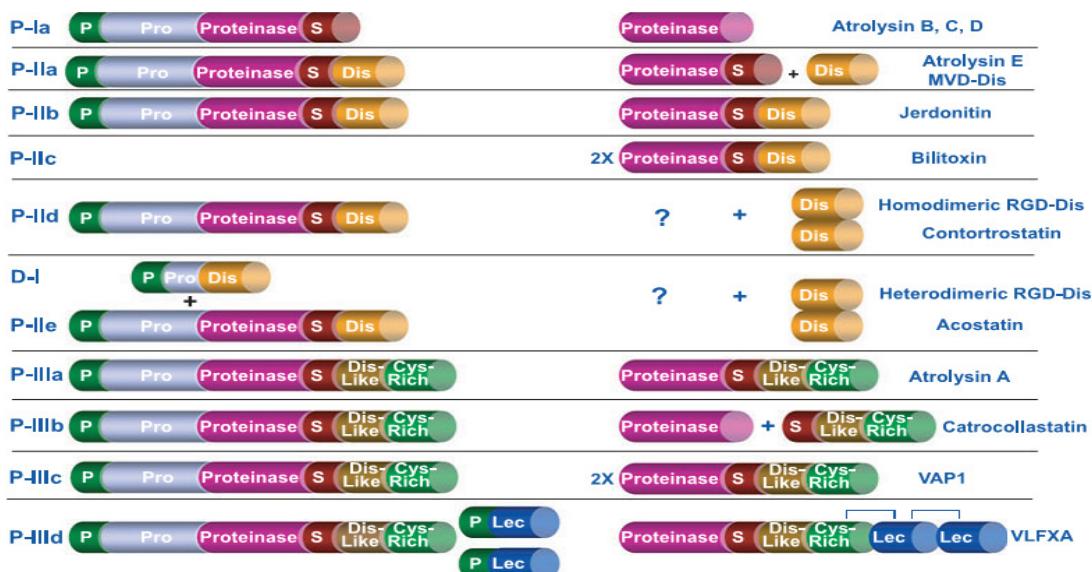
Em 2005, FOX & SERRANO subdividiram as classes P-II e P-III das SVMPs em subclasses P-II, P-IIa, P-IIb, P-III, P-IIIa e P-IIIb. Estas alterações foram realizadas com base nas análises das sequências de cDNA de diversas proteases e desintegrinas isoladas de peçonhas de serpentes, sendo que estas novas subclasses passaram a incluir proteases que sofreram ação proteolítica e liberaram o domínio metaloprotease, desintegrina livre e/ou domínio metaloprotease ligado ao domínio tipo desintegrina e rico em cisteína (D/C). Também nessa classificação foram incluídas as formas diméricas.

Posteriormente, FOX & SERRANO (2008) novamente propuseram uma reclassificação onde 11 subclasses de SVMPs foram identificadas: Pla, PIIa, PIIb, PIIc, PIId, PIle, D-I, PIIIa, PIIIb, PIIIc e PIId. Nessa reclassificação, a classe PIV foi incluída na classe PIII. O critério utilizado para reclassificar as SVMPs foi essencialmente baseado nas características dos precursores das metaloproteases, bem como nos produtos gerados após processamento e modificação pós-traducional durante o processo de síntese (Figura 6).

De acordo com essa nova reclassificação a classe P-Ia comprehende metaloproteases que possuem apenas o domínio metaloprotease. As classes PII

e PIII foram divididas em subclasses de acordo com as modificações pós-traducionais, como exemplo a homodimerização (PII-c e PIIlc), ou a proteólise entre os domínios metaloproteases M e desintegrina D (PIIb), e a proteólise que libera os domínios metaloprotease e o domínio tipo desintegrina/rico em cisteína D/C (P-IIlc). A antiga classe PIV foi reclassificada como subclasse da classe PIII (P-IIId) uma vez que nenhum precursor específico contendo todos os domínios desta classe foi descrito, indicando que essas proteases surgem por modificação pós-traducionais da estrutura P-III.

A grande diversidade estrutural de metaloproteases presentes em uma mesma peçonha tem permitido que uma série de trabalhos que buscam o isolamento e a caracterização estrutural e funcional possam ser realizados. A maioria destes trabalhos tenta correlacionar a sua complexidade estrutural à diversidade funcional para a compreensão da fisiopatologia do envenenamento na qual esta classe de enzimas pode estar envolvida.



**Figura 6: Reclassificação das SVMPs proposta por FOX & SERRANO (2008) baseada em estudos de transcriptoma e de estrutura de SVMPs já elucidadas. Os espaços com interrogação indicam que o precursor não foi encontrado em peçonhas.**

O surgimento das diferentes classes de SVMPs tem sido alvo de estudos. CASEWELL et al. (2011) sugerem que diferentes metaloproteases e/ou domínios livres que são encontradas nas diversas peçonhas de serpentes são consequências de um processo evolutivo que acarreta na modificação de genes com a eliminação de determinados domínios. Esta hipótese parece ser confirmada no estudo de clonagem, sequenciamento e análise por cDNA de SVMPs expressas na glândula venenífera da serpente de *Bothrops neuwiedi* (MOURA-DA-SILVA et al., 2011). Neste estudo os autores encontraram uma grande diversidade de SVMPs que foram distribuídas pelas diferentes classes.

Além da hipótese de ocorrência de modificações evolutivas nos genes que expressam as SVMPs, outro aspecto que aponta para a diversidade de SVMPs e/ou domínios presentes nas peçonhas de serpentes, é o fato de que as SVMPs de alta massa molecular podem sofrer autólise e/ou ação proteolítica, liberando assim na peçonha os domínios livres. As SVMPs da classe P-II, podem sofrer proteólise dando origem a SVMPs da classe P-I e domínio desintegrina livre, ou SVMPs da classe P-III podem gerar SVMPs da classe P-I e o domínio tipo desintegrina e rico em cisteína (domínio D/C) (JUÁREZ et al., 2008; KANG et al., 2011). Fato desta natureza foi demonstrado no trabalho de PEICHOTO et al., (2010), no qual relatou-se a alta capacidade em sofrer autólise da *Patagonifibrase*, uma SVMP hemorrágica da classe P-III de 52.2kDa proveniente da peçonha de *Philodryas patagoniensis*. No seu processo de autólise foi identificado um fragmento de 32.6kDa que corresponde ao domínio D/C.

## 5-Mecanismo de ação das SVMPs

A diversidade estrutural das SVMPs confere às mesmas a capacidade de interferir em diversos sistemas celulares. De modo geral, o mecanismo de ação das SVMPs está relacionado à proteólise de componentes da matriz extracelular (GUTIÉRREZ et al., 2005), proteínas plasmáticas, proteínas de membrana celular e à interação com receptores específicos, como integrinas de superfície de plaquetas (KAMIGUTI et al., 2005; ESCALANTE et al., 2006; ESCALANTE et al., 2011; SAJEVIC et al., 2011), células endoteliais (COMINNETTI et al., 2004) e

fibroblastos (ZIGRINO et al., 2002), ativando ou inibindo a resposta celular. Esses efeitos podem resultar em várias alterações fisiopatológicas tais como inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 2005; SAJEVIC et al., 2011; MOURA-DA-SILVA & BALDO, 2012).

Há décadas que a ação proteolítica das SVMPs tem sido relatada. BARAMOVA et al. (1989) avaliaram a ação proteolítica de diversas metaloproteases hemorrágicas sobre proteínas da matriz extracelular e constataram que estas enzimas apresentavam capacidade de degradação de diversos substratos, no entanto tinham especificidades diferentes. Trabalho semelhante foi realizado por ESCALANTE et al. (2006), avaliando a ação de SVMPs sobre Matrigel (mistura de componentes da membrana basal). Neste estudo foi demonstrado que tanto *BaP1* (uma metaloprotease fracamente hemorrágica da classe P-I de *Bothrops asper*) quanto a *Jararagina* (metaloprotease fortemente hemorrágica da classe P-III de *Bothrops jararaca*) foram capazes de degradar componentes da membrana basal. No entanto *BaP1* tem sua ação limitada para laminina e nidogênio, enquanto *Jararagina* degrada todos os componentes, incluindo forte ação sobre nidogênio. A degradação de componentes da matriz extracelular e componentes da membrana basal acarreta na instabilidade e perda da integridade dos capilares e por consequência resulta no extravasamento sanguíneo.

Um dos principais eventos que caracterizam os envenenamentos por serpentes da família Viperidae é o sangramento (hemorragia local e sistêmica). Algumas metaloproteases da classe P-I, P-II e principalmente as da classe P-III são comprovadamente as responsáveis por este quadro hemorrágico. No entanto as metaloproteases da classe P-I quando são capazes de provocar hemorragia, são classificadas como fracamente hemorrágicas enquanto as SVMPs da classe P-III são, em geral, capazes de provocar fortes hemorragias, apresentando as menores DMH (Dose Mínima Hemorrágica) e os mais elevados níveis de toxicidade entre as SVMPs (BJARNASON & FOX, 1994; BALDO et al., 2010). Esta diferença de ação hemorrágica observada entre as classes P-I e P-III das SVMPs é atribuída principalmente à composição estrutural dos domínios que são encontrados em cada tipo de protease.

O entendimento do mecanismo da ação hemorrágica das SVMPs tem sido bastante explorado, e estes demonstram que o dano na microvasculatura induzidos pelas SVMPs é a principal causa do quadro hemorrágico. Dois mecanismos justificam estes danos e tentam explicar a atividade hemorrágica das toxinas. O primeiro é conhecido como "*hemorrhage per rhesis*". Este mecanismo propõe que as células endoteliais sejam afetadas por uma rápida degradação proteolítica de proteínas que compõem a membrana basal, tais como colágeno tipo IV, fibronectina e laminina. Como consequência desta ação enzimática, ocorrem instabilidade e lesões celulares, ocasionando lacunas e provocando o extravasamento de eritrócitos e outros componentes sanguíneos para o espaço intersticial. No entanto neste mecanismo não há alterações nas junções intercelulares das células endoteliais. No segundo mecanismo, conhecido como "*hemorrhage per diapedesis*", o extravasamento sanguíneo ocorre por alterações nas junções endoteliais, ou seja, eritrócitos e outros componentes sanguíneos agora escapam por ampliação nas junções endoteliais causado por proeminente inflamação gerada pelo envenenamento (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

Estudos recentes realizados por BALDO et al, (2010) indicam que a principal causa da hemorragia está realmente associada a danos causados nos microvasos e a capacidade da enzima em permanecer ancorada na célula. Estes estudos indicam que as SVMPs da classe P-III são potentes hemorraginas presentes nas peçonhas ofídicas pelo fato de possuírem em sua estrutura o domínio metaloprotease que apresenta a ação proteolítica e em adição os domínios tipo desintegrina e rico em cisteína que proporcionam a capacidade de aderirem a componentes integrantes da membrana basal, principalmente colágeno tipo IV, o que levaria ao acúmulo de toxinas nos vasos, potencializando os danos causados na microvasculatura. Além disto, outro aspecto importante, que é apontado como potencializador da ação hemorrágica das SVMPs da classe P-III, é a capacidade de resistir ao inibidor plasmático de proteases α2-macroglobulina (α2-M) (ESCALANTE et al., 2011).

As SVMPs da classe P-III têm sido designadas como as mais potentes toxinas hemorrágicas das peçonhas de serpentes, no entanto há relato na literatura de SVMP classe P-III que não são hemorrágicas e que apresentam

atividade pró-coagulantes. A *Berythreactivase* isolada de *Bothrops erythromelas*, é um ativador de pró-trombina pertencente a esta classe e que apesar da grande similaridade estrutural com a *Jararagina*, não induz hemorragia (Silva, 2003).

As SVMPs da classe P-I podem ou não provocarem hemorragia, esta ação pode estar relacionada à sequência de aminoácidos que compõe a estrutura primária destas enzimas. Esta composição provavelmente irá determinar a especificidade de ação proteolítica sobre componentes da membrana basal e por consequência os danos celulares seriam de maneira diferenciadas. Estudos de análise da estrutura terciária de SVMPs observaram que as toxinas fracamente hemorrágicas e não hemorrágicas da classe P-I apresentam alto nível de similaridade, com exceção de uma região próxima do sitio catalítico em que há maior variação na composição de aminoácidos diferenciando assim as hemorrágicas das não hemorrágicas; entretanto os resultados não são conclusivos (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAUJO, 2004; ESCALANTE et al., 2011). Além disto, as metaloproteases da classe P-I são mais suscetíveis à ação do inibidor de protease  $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-M), o que justificaria a capacidade de provocar hemorragia e toxicidade local, em detrimento dos efeitos sistêmicos (ESCALANTE et al., 2011).

Entre as várias funções das SVMPs, destaca-se a sua capacidade em interferir na hemostasia e principalmente na função plaquetária. As metaloproteases/desintegrinas podem inibir a agregação plaquetária por conterem sua estrutura a sequência tripeptídica **RGD** (**R**- Arginina; **G**- Glicina e **D**- Ácido aspártico) que pode interagir com integrinas de plaquetas, tais como  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ , impedindo assim a ligação com o fibrinogênio e colágeno, respectivamente. Outra forma de impedir a agregação é a sua capacidade de ação proteolítica sobre integrinas e/ou sobre o vWF (fator de Von Willenbrand) (WIJEWICKREMA et al., 2005; SAJEVIC et al., 2011; MOURA-DA-SILVA & BALDO, 2012). É importante salientar que outras sequências tripeptídicas diferentes da RGD, já foram encontradas em desintegrinas das peçonhas de serpentes; sequências tais como VGD, MLD, KGD, entre outras e que apresentam função semelhante à sequência clássica RGD no que se refere à interferência com a agregação plaquetária (CALVETE et al., 2005).

As metaloproteases da classe P-III não apresentam o sequência RGD, no entanto estas apresentam um domínio contendo a sequencia XCD denominado tipo desintegrina que também tem demonstrado capacidade de interferir na função plaquetária. A *Jararagina*, uma metaloprotease da classe P-III com domínio tipo desintegrina (*desintegrina-like*), foi estudada quanto ao seu potencial em interferir na agregação plaquetária. Esta enzima foi isolada da peçonha de *Bothrops jararaca* (PAINÉ et al., 1992) e possui alta atividade hemorrágica e apresenta a capacidade de inibir a agregação plaquetária por bloquear a ligação do colágeno à integrina  $\alpha_2\beta_1$  presente na membrana das plaquetas; também tem a capacidade de ligar-se ao domínio  $\alpha$  da integrina e degradar a cadeia  $\beta$ , outro aspecto que justifica a capacidade da protease em inibir a agregação plaquetária (BALDO et al., 2010; MOURA-DA-SILVA & BALDO, 2012).

As células endoteliais também são importantes alvos de ação das SVMPs. Essas proteínas podem interferir na viabilidade e adesão de células endoteliais e induzir apoptose. Tanjoni et al., (2005), descrevem que a *Jararagina* induziu apoptose em células tEnd por um mecanismo denominado *anoikis*. Além disso, as SVMPs podem ativar as células endoteliais induzindo a expressão de óxido nítrico, IL-8 e moléculas de adesão (SCHATTNER et al., 2005, LOPES et al., 2012).

A atividade inflamatória grave após o envenenamento botrópico pode ser causada por um conjunto de componentes bioquimicamente heterogêneos e com especificidades diversas, tais como: pequenos peptídeos, fosfolipases A<sub>2</sub>, proteases e enzimas diversas. As SVMPs induzem a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, agravando o dano tecidual local que ocorre após o envenenamento. A resposta inflamatória causada pelas SVMPs é caracterizada principalmente por edema, recrutamento de leucócitos e liberação de citocinas. Diversos autores relataram eventos inflamatórios relacionados às SVMPs, tais como: *BaP1* de *Bothrops asper* e *Neuwiedase* de *Bothrops neuwiedi* atuam induzindo liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação de algumas metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000; LOPES et al., 2009). Clissa et al. (2001) mostraram que a *Jararagina*

estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, induzindo um aumento de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ .

Estes relatos reafirmam que as SVMPs apresentam uma ampla gama de ações e importante participação no quadro fisiopatológico relacionado ao envenenamento ofídico.

## 6-*Bothrops pauloensis* e *Bothrops leucurus* (Família: Viperidae)

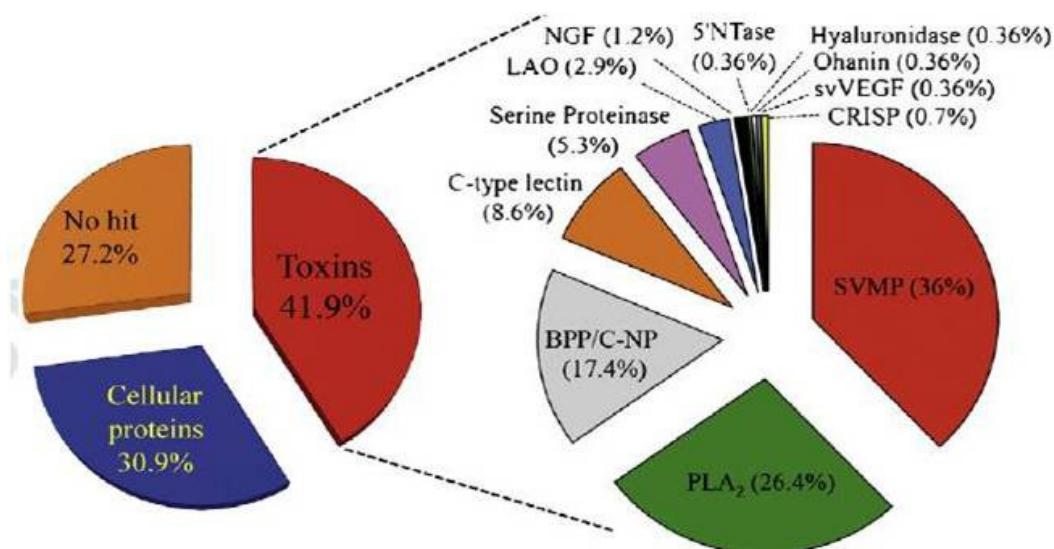
A espécie *Bothrops pauloensis* (Família Viperidae) pode ser encontrada na região central do Brasil nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e São Paulo. Esta serpente foi descrita inicialmente por AMARAL (1925) como *Bothrops neuwiedi pauloensis* sendo uma das 12 subespécies do complexo de *Bothrops neuwiedi*. Ao longo das últimas décadas as serpentes do complexo *Bothrops neuwiedi* passaram por revisões e reclassificações sistemáticas (SILVA, 2000; SILVA & RODRIGUES, 2008; MACHADO, 2010), sendo que as 12 subespécies (*B. n. bolivianus*, *B. n. diporus*, *B. n. goyazensis*, *B. n. lutzi*, *B. n. matogrossensi*, *B. n. meridionalis*, *B. n. neuwiedi*, *B. n. paranaensis*, *B. n. pauloensis*, *B. n. piauhensis*, *B. n. pubescens* e *B. n. urutu*) foram reclassificadas em sete subespécies distintas. A subespécie *B. neuwiedi pauloensis* foi denominada como uma nova espécie *Bothrops pauloensis*.

Estudos realizados por FENWICHK et al. (2009) a partir de características morfológicas e moleculares, como análises do DNA mitocondrial de serpentes da América Sul, reclassificaram algumas serpentes antes botrópicas como pertencendo a um novo gênero. Nessa reclassificação as espécies *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops lutzi*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops pubescens*, *Bothrops diporus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops marmoratus* e *Bothrops erythromelas* passaram a pertencer ao gênero *Bothropoides*, assim como as pertencentes ao grupo jararaca (*B. jararaca*, *B. insularis* e *B. alcatraz*). No entanto, em setembro de 2012 a SBH considerando estudos de BERNILS & COSTA, (2012) voltaram a classificar as serpentes do gênero *Bothropoides* como

*Bothrops*, sendo assim a serpente *Bothropoides pauloensis* voltou a ser denominada de *Bothrops pauloensis*.

RODRIGUES et al., (2012) realizaram estudos de transcriptoma extraiendo a glândula venenífera da serpente de *Bothrops pauloensis* e a partir do RNA total obtiveram informações precisas de substâncias expressas na glândula; com estes dados construíram uma biblioteca parcial de cDNA dos componentes expressos. Este trabalho revelou uma abundância de substâncias, sendo que as toxinas representam cerca de 41,9%, as proteínas celulares compreendem 30,9% e outros componentes não identificados constituem 27,2% (Figura 7).

Em relação às toxinas biologicamente ativas, as SVMPs mostraram-se como as mais abundantes compreendendo aproximadamente 36%, seguida das fosfolipases com 26,4%. Resultados que justificam a elevada atividade proteolítica, hemorrágica e miotóxica observada em experimentos realizados utilizando a peçonha desta serpente. Além disto, foi observado um predomínio de transcritos que codificam metaloproteinases da classe P-III.



**Figura 7: Representação em porcentagem das substâncias expressas na glândula venenífera da serpente de *Bothrops pauloensis*. (Figura extraída de RODRIGUES et al., 2012).**

A espécie *Bothrops leucurus*, apresenta predominância na costa litorânea brasileira de floresta de mata atlântica, abrangendo o estado do Ceará até o

Espírito Santo, na região Sudeste (PRIANTI Jr. et al., 2003). Segundo LIRA-DA-SILVA et al., (2009), no estado da Bahia, esta espécie ocorre em todo a sua extensão, com exceção do Vale do Rio São Francisco (caatinga) e extremo-oeste (cerrado). E em relação aos acidentes ofídicos notificados no Hospital Geral Roberto Santos em Salvador (Bahia), no período de 1982 a 1992, mais de 90% foram causados por *Bothrops leucurus*.

As peçonhas das serpentes *B. pauloensis* e *B. leucurus* têm sido bastante exploradas no isolamento e na caracterização funcional e estrutural de seus componentes biologicamente ativos (Tabela I).

Apesar de ambas as peçonhas terem sido amplamente estudadas, estas apresentam uma diversidade de componentes bioativos ainda não explorados. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo principal o isolamento e a caracterização funcional de metaloproteases presentes nessas duas peçonhas.

Os resultados de caracterização bioquímica e funcional de duas metaloproteases isoladas das peçonhas de *B. pauloensis* e *B. leucurus* apresentados no presente trabalho, corroboram com as diferentes alterações sistêmicas e locais induzidas por SVMPs sugerindo os seus papéis na fisiopatologia do envenenamento induzido por essas duas espécies.

Tabela I. Lista de toxinas purificadas das peçonhas das serpentes de *Bothrops pauloensis* e *Bothrops leucurus*.

<b>Espécie</b>	<b>Toxina</b>	<b>Mr(KDa)</b>	<b>Atividade</b>	<b>Referência</b>
<i>B. pauloensis</i>	<i>BnSP-6</i>	13,5	Miotóxica	Rodrigues et al., 1998.
<i>B. pauloensis</i>	<i>BnSP-7</i>	13,7	Miotóxica, Inflamatória, Edematogênica	Rodrigues et al., 1998.
<i>B. pauloensis</i>	<i>BnpTX-I</i> e <i>BnpTX-II</i>	14	Miotóxica, Citotóxica, Edematogênica,Bactericida	Rodrigues et al., 2004.

<i>B. pauloensis</i>	<i>BpPLA<sub>2</sub></i>	15,8	Edematogênica, Miotóxica	Rodrigues et al., 2007.
<i>B. pauloensis</i>	<i>BpSP-I</i>	30	$\alpha$ Fibrinogênase,Thrombina-like, Kalicreina-Like	Costa et al., 2009.
<i>B. pauloensis</i>	<i>Bp-LAAO</i>	65	Indutora de agregação plaquetária, Antitumoral, Antibactericida	Rodrigues et al., 2009.
<i>B. pauloensis</i>	<i>BpMP-I</i>	20	$\alpha$ e $\beta$ -fibrinogênase, não hemorrágica.	Naves-de-Souza et al., 2012.
<i>B. pauloensis</i>	<i>BpLeuc(lectina)</i>	33,6	Antibactericida	Castanheira et al., 2013
<i>B. pauloensis</i>	<i>Bothropoidin</i>	49,6	$\alpha$ Fibrinogênase,Hemorragica, Inibidora de agregação plaquetaria.	Presente trabalho
<i>B. leucurus</i>	<i>Leuc-a</i>	22	$\alpha$ -Fibrinogênase,Não Hemorragica	Bello et al., 2006.
<i>B. leucurus</i>	<i>BIK-PLA<sub>2</sub> e BID-PLA<sub>2</sub></i>	14	Mitóxica, Citotóxica.	Higuchi et al., 2007.
<i>B. leucurus</i>	<i>Leucorubin</i>	29	$\alpha$ -fibrinogênase, Kalicreina- ike.	Magalhães et al., 2007.
<i>B. leucurus</i>	<i>Leuc-B</i>	55	$\alpha$ -fibrinogênase, hemorrágica.	Sanches et al., 2007.
<i>B. leucurus</i>	<i>BleucLAAO</i>	80	Antibactericida	Torres et al., 2010.
<i>B. leucurus</i>	<i>BIL(lectina)</i>	30	Antibactericida.	Nunes et al., 2011.
<i>B. leucurus</i>	<i>BleucMP</i>	23	$\alpha$ e $\beta$ -fibrinogênase, não hemorrágica,edematogênica.	Gomes et al., 2011.

<i>B. leucurus</i>	<i>Bl-LAAO</i>	60	Citotóxica, Inibição de agregação plaquetária.	Naumann et al., 2011.
<i>B. leucurus</i>	<i>Bl-PLA<sub>2</sub></i>	15	Mitótica, Edematogênica, Pró-inflamatória.	Nunes et al., 2011.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, A. 1925. A general consideration of snake poisoning and observations of neotropical pit vipers. Contrib. Harvard Inst. Trop. Biol. 2, 1-64.
- Akao, P.K., Tonoli, C.C., Navarro, M.S., Cintra, A.C., Neto, J.R., Arni, R.K., Murakami, M.T., 2010. Structural studies of *BmooMPalpha-I*, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. Toxicon, 55, 361-368.
- Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T.M., Moura-da-Silva, A.M., 2010. Mechanism of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and in situ hydrolysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4, e727.
- Baramova, E.N., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1989. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. Arch Biochem Biophys. 275, 63-71.
- Bello, C.A., Hermogenes, A.L., Magalhaes, A., Veiga, S.S., Gremski, L.H., Richardson, M., Sanchez, E.F., 2006. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops Leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. Biochimie. 88, 189-200.
- Berger, M., Pinto, A.F., Guimaraes, J.A., 2008. Purification and functional characterization of *Bothrojaractivase*, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. Toxicon 51, 488–501.
- Bérnilds, R. S. e H. C. Costa (org.). 2012. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.1. Disponível em <http://www.sbsherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia.
- Bjarnason, K. B. & Fox, J. W. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. Pharmac. Ther. v. 62, p. 325.
- Bode, W.; Gomis-Ruth, F. X.; Stockler, W. 1993. *Astacins, serralysins*, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXX-HXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the '*metzincins*'. FEBS Letters. v. 331, p. 134-140.
- Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C., Monleon, D., Esteve, V., Celda, B., Juarez, P., Libia Sanz, L 2005. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function Toxicon 45 1063-1074.
- Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V. 2003. Animais Peçonhentos no Brasil (Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes). São Paulo, Ed. Sarvier.

Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Harrison, R.A., Renjifo, C., Wüster, W., 2011. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. Mol Biol Evol. 28, 2637-2649.

Castanheira, L.E., Nunes, D.C., Cardoso, T.M., Santos, P.D., Goulart, L.R., Rodrigues, R.S., Richardson, M., Borges, M.H., Yoneyama, K.A., Rodrigues, V.M., 2013. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (*BpLec*) from *Bothrops pauloensis* snake venom. Int J Biol Macromol. 54, 57-64.

Clissa, P.B., Laing, G.D., Theakston, R.D.G., Mota, I., Taylor, M.J., Moura-da-Silva, A.M., 2001. The effect of *jararhagin*, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. Toxicon 39, 1567-1573.

Coates, M. & Ruta, M. 2000. Nice snakes, shame about the lags. Trends Ecol. Evol. , 15, 503-507.

Cominnetti, M.R., Terruggi, C.H., Ramos, O.H., Fox, J.W., Mariano-Oliveira, A., De Freitas, M.S., Figueiredo, C.C., Morandi, V., Selistre-de-Araujo, H.S., 2004. *Alternatin-C*, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation *in vitro*. J. Biol. Chem. 279, 18247-18255.

Costa, F.L.S., Rodrigues, R.S., Izidoro, L.F.M., Menaldo, D.L., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M.I., Fuly, A.L., Soares, S.G., Selistre-de-Araújo, H.S., Barraviera, B., Soares, A.M., Rodrigues, V.M. 2009. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. Toxicon 54, 725-735.

Chippaux, J.P., 1998. *Bulletin of the World Health Organization*, 76, 515-524.

Escalante, T., Shannon, J., Moura-da-Silva, A.M., Gutiérrez, J.M., Fox, J.W., 2006. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. Arch Biochem Biophys. 455, 144-153.

Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. Journal of Proteomics 74, 1781-1794.

Fenwick, A.M., Gutberlet Jr., R.L., Evans, J.A., Parkinson, C.L., 2009. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). Zool. J. Linn. Soc. 156, 617–640.

Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, Key members of the M12 reprotoxin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969-985.

Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* 275, 3016-3030.

Gomes, M.S.R., Queiroz, M.R.Q., Mamede, C.C.N., Mendes, M.M., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M.I., Sousa, M.V., Aquino, E.N., Castro, M.S., Oliveira, F., Rodrigues, V.M. 2011. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (*BleucMP*) from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 153, 290-300.

Gomis-Rüth, F.X., Kress, L.F., Kellermann, J., Mayr, I., Lee, X., Huber, R., Bode, W., 1994. Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zinc-endopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. *J Mol Biol.* 239, 513-544.

Gomis-Rüth, F.X., 2003. Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. *Molecular Biotechnology* 24, 157-202.

Gomis-Rüth, F.X., Botelho, T.O., Bode, W., 2012. A Standard orientation for metallopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 157-163.

Gutiérrez, J. M., Rucavado, A. 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie.* v. 82, p. 841-850.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011.

Grams, F., Huber, R., Kress, L.F., Moroder, L., Bode, W., 1993. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett.* 335, 76–80.

Higuchi, D.A., Barbosa,C.M., Bincoletto,C., Chagas, J.R., Magalhaes, A., Richardson, M., Sanchez, E.F., Pesquero, J.B., Araujo, R.C., Pesquero, J.L., 2007. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. *Biochimie* 89, 319-328.

Juárez, P., Comas, I., González-Candelas, F., Calvete, J.J., 2008. Evolution of snake venom disintegrins by positive Darwinian selection. *Mol Biol Evol.* 25, 2391-2407.

Lira-da-Silva, R. M., Mise, Y.F., Casais-e-Silva, L. L., Ulloa, J., Hamdan, B., Brazil, T. K., 2009. Snakes of medicinal importance in Northeast of Brazil. Gaz. méd. Bahia 79, 7-20.

Lopes, D.S., Baldo, C., Oliveira, C. F., Alcântara, T.M., Oliveira, J.D., Gourlart, L.R., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M.I., Moura-da-Silva, A.M., Clissa, P.B., Rodrigues V. M., 2009. Characterization of inflammatory reaction induced by *neuwiedase*, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. Toxicon 54, 42-9.

Lopes, D.S., Faquim-Mauro, E., Magalhães, G.S., Lima, I.C., Baldo, C., Fox, J.W., Moura-da-Silva, A.M., Clissa, P.B., 2012. Gene expression of inflammatory mediators induced by *jararhagin* on endothelial cells. Toxicon 60, 1072-1084.

Machado, T., Filogenia molecular das espécies de *Bothrops* do grupo *neuwiedi* (Serpentes, Viperidae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 104pp. 2010.

Magalhães, A., Magalhães, H.P., Richardson, M., Gontijo, S., Ferreira, R.N., Almeida, A.P., Sanchez, E.F., 2007. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 146, 565-575.

Ministério da Saúde do Brasil: Sinan/SVS/MS - atualizado em 21/06/2012 ([http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=33249](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=33249))

Markland, F. S., 1998. Snake venoms and the haemostatic system. Toxicon, v.36, p. 1749-1800.

Moura-da-Silva, A.M., Furlan, M.S., Caporrino, M.C., Grego, K.F., Portes-Junior, J. A., Clissa, P.B., Valente, R.H., Magalhães, G.S., 2011. Diversity of metalloproteinases in *Bothrops neuwiedi* snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. BMC Genet., 12:94.

Moura-da-Silva, A.M. & Baldo, C., 2012. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. Toxicon 60, 280-289.

Naves de Souza, D.L., Gomes, M.S.R., Ferreira, F.B., Rodrigues, R.S., Achê, D.C., Richardson, M., Borges, M.H., Rodrigues, V.M., 2012. Biochemical and Enzymatic characterization of *BpMP-I*, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. Comp. Biochem. Physiol. Part B 161, 102-109.

Naumann, G.B., Silva, L.F., Silva, L., Faria, G., Richardson, M., Evangelista, K., Kohlhoff M., Gontijo, C.M.F., Navdaev, A., Rezende, F.F., Eble,

J.A., Sanchez, E.F., 2011. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by na L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 157-163 *Biochim. (BBA)-General Subjects*, 1810, 683-694

Nunes, D.C., Rodrigues, R.S., Lucena, M.N., Cologna, C.T., Oliveira, A.C., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M.I., Arantes, C.E., Ueira-Vieira, C., Rodrigues, V.M., 2011. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 154, 226-233.

Nunes, E.S., Souza, M.A., Vaz, A.F., Santana, G.M., Gomes, F.S., Coelho, L.C., Paiva, P.M., Silva, R.M., Silva-Lucca, R.A., Oliva, M.L., Guarnieri, M.C., Correia, M.T., 2011. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol Part B*. 159, 57-63.

Paine, M.J., Desmond, H.P., Theakston, R.D., Crampton, J.M., 1992. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *J. Biol. Chem.* 267, 22869-22876.

Peichoto, M.E., Leme, A.F., Pauletti, B.A., Batista, I.C., Mackessy, S.P., Acosta, O., Santoro, M.L., 2010. Autolysis at the disintegrin domain of *patagonfibrase*, a metalloproteinase from *Philodryas patagoniensis* (Patagonia Green Racer; Dipsadidae) venom. *Biochim Biophys Acta*. 1804, 1937-1942.

Prianti Jr., A.C.G., Robeiro, W., Lopes-Martins, R.A.B., Lira-da-Silva, R.M., Prado-Franceschi, J., Rodrigues-Simioni, L., cruz-Hofling, M.A., Leite, G.B., Hyslop, S., Cogo, J.C., 2003. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon* 41, 595-603.

Kamiguti, A.S., 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1042-1049.

Kang, T.S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrielink, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R.K., Singh, T.P., Kini, R.M., 2011. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FESB Journal* 278, 4544-4576.

Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D.G., de Silva, H.J., 2008. The global burden of snake bite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine* 11, e218.

Kini, R.M., Zhang, C.Y., Tan, B.K., 1997. Pharmacological activity of the interdomain segment between metalloproteinase and disintegrin domains. *Toxicon* 35, 529-535.

Kochva, E. 1986. The origin of snakes and evolutionary of the venom apparatus. *Toxicon*. v. 25, n.1, p.65-106.

Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araujo, H.S., 2004. Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using bioinformatic tools. *Toxicon* 44, 529-538.

Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araujo, H.S., 2006. Review: Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 142, 328-346.

Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Mancin, A.C., Fontes, M.R.M., Homsi-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R. 1998. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 121, 215-222.

Rodrigues, V.M., MARCUSSI, S., Cambraia, R.S., Araújo, A.L., Malta-Neto, N.R., Hamaguchi, A., Ferro, E.A.V., Homsi-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R., Soares, A.M., 2004. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon* 44, 305-314.

Rodrigues, R.S., Izidoro, L.F.M., Teixeira, S.S., Silveira, L.B., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M. I., Selistre-de-Araújo, H.S., Giglio, J.R., Fuly, A.L., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., 2007. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* 50, 153-165.

Rodrigues, R.S., Silva, J.F., Boldrine-França, J., Fonseca, F.P.P., Otaviano, A. R., Henrique-Silva, F., Hamaguchi, A., Magro, A.J., Braz, A.S.K., Dos Santos, J., Homsi-Brandeburgo, M.I., Fontes, M.R.M., Fuly, A., Soares, A.M., Rodrigues, V.M. 2009. Structural and functional properties of *Bp-LAAO*, a new l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie*. 91, 490-501.

Rodrigues, R.S., Boldrini-França, J., Fonseca, F.P.P., Torre, P.L., Henrique-Silva, F., Sanz, L., Calvete, J.J., Rodrigues, V.M., 2012. Combined snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. *Journal of Proteomics* 75, 2707-2720.

Sajevic, T., Leonardi, A., Krizaj, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57, 627-645.

Sanchez,E.F., Gabriel,L.M., Gontijo,S., Gremski,L.H., Veiga,S.S., Evangelista,K.S.Eble,J.A., Richardson,M.,2007. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, *Leucurolysin-B*, from *Bothrops leucurus* venom. Arch. Biochem. Biophys. 468, 193-204.

Schattner, M., Fritzen, M., Ventura, J.S., Modesto, J.C.A., Pozner, R.G., Moura-Da-Silva, A.M., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2005. The snake venom metalloproteases *berythractivase* and *jararhagin* activate endothelial cells. Biol. Chem., 386, 369-374.

Selistre-de-Araújo, H.S. & Ferreira de Souza, D.H., 2007. Métodos em Toxinologia (toxinas de serpentes). São Carlos, Ed. UFSCar, 258 p.

Silva, V.X. 2000. Revisão sistemática do complexo (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo, 134pp.

Silva, M. B., Schattner, M., Ramos, C.R., Junqueira-De-Azevedo, I. L., Guarnieri, M. C., Lazzari, M.A., Sampaio, C.A., Pozner, R.G., Ventura, J.S., Ho, P.L., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2003. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning, Biochem. J., 369, 129-139.

Silva, V.X. & Rodrigues, M.T., 2008. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpents, Viperidae) with description of a new species. Phylomedusa 7, 45-90.

Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., Mckay, D. B., Bode, W., 1995. The metzincins-topological and sequential relations between the *astacins*, *adamalysins*, *serralysins* and *matrixins* (*collagenases*) define a superfamily of zinc-peptidases. Protein Sci. , 4, 823-840.

Tanjoni, I., Weinlich, R., Della-Casa, M.S., Clissa, P.B., Saldanha-Gama, R.F., Freitas, M.S., Barja-Fidalgo, C., Amaranto-Mendes, G.P., Moura-da-Silva, A.M., 2005. *Jararhagin*, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (*anoikis*) selective to endothelial cells. Apoptosis 10, 851-861.

Takeda, S., Takeya, H., Iwanaga, S., 2012. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics 1824, 164-176.

Tashima, A.K., Sanz, L., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T., Calvete, J.J., 2008. Snake venomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. Journal of Proteomics 71, 473-485.

Terra, R. M. S., Pinto, A. F. M., Guimarães, J.A., Fox, J. W., 2009. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. Toxicon 54, 836-844.

Torres, A.F.C., Dantas, R.T., Menezes, R.R.P.P.B., Toyama, M.H., Filho, E.D., Oliveira, M.F., Nogueira, N.A.P., Oliveira, M.R., Monteiro, H.S.A., Martins, A.M.C., 2010. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 4, 614-622.

Valle, L. A. & Brites, C. L. V., 2008. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Zoociências*. 10:155-161

Watanabe, L., Shannon, J.D., Valente, R.H., Rucavado, A., Alape-Girón, A., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., Arni, R.K. 2003. Amino acid sequence and crystal structure of *BaP1*, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. Protein Sci. 12, 2273-2281.

Wijeyewickrema, L.C., Berndt, M.C., Andrews, R.K., 2005. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. Toxicon 45, 1051-1061.

White, J., 2005. Snake venoms and coagulopathy. Toxicon 45, 951-967.

Zigrino, P., Kamiguti, A.S., Eble, J., Drescher, C., Nischt, R., Fox, J.W., Mauch, C., 2002. The reprolysin *jararhagin*, a snake venom metalloproteinase, functions as fibrillar collagen agonist involved in fibroblast adhesion and signaling. J. Biol. Chem. 277, 40528-40535.

## *Capítulo II*

---

# *Caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease hemorrágica isolada da peçonha da serpente de Bothrops pauloensis (Família Viperidae)*

---

- Com base nas normas do COGEB, este capítulo foi escrito utilizando os critérios de publicação da Revista TOXICON ([www.journals.elsevier.com/toxicon](http://www.journals.elsevier.com/toxicon)).

## *RESUMO*

No presente trabalho demonstramos a caracterização bioquímica e funcional da *Botropoidina*, uma metaloprotease hemorrágica isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*. Esta proteína foi purificada após três passos cromatográficos: CM-Sepharose fast flow, HiTrep Sephadryl S-300 RP, HiTrep Capto Q. *Botropoidina* mostrou-se homogênea em SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras e apresentou uma única cadeia polipeptídica de 49.558 Da por análises de MALDI-TOF. A proteína apresentou ponto isoelétrico de 3,76 e a sequência de dois fragmentos obtidos por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) em MS (MALDI-TOF\TOF) apresentou *score* significativo quando comparado com outras SVMPs. Esta enzima apresentou atividade proteolítica sobre azocaseína, as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio, fibrina, colágeno e fibronectina. A enzima foi estável na faixa de pH de 6-9 e em baixas temperaturas quando ensaiada sobre a azocaseína. Além disso, sua atividade foi inibida por EDTA, 1,10-fenantrolina e  $\beta$ -mercaptoetanol. Esta enzima agiu sobre a coagulação sanguínea alterando os tempos de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e de protrombina (TP), além de tornar o sangue de camundongos incoagulável. *Botropoidina* foi capaz de induzir hemorragia (DMH= 0,98 $\mu$ g) e necrose no músculo gastrocnêmio de camundongos, demonstrando uma alta toxicidade. Esta enzima também foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colagéno e ADP e interferiu na adesão e viabilidade de células endoteliais tEnd. Considerados em conjunto, estes resultados nos levam a sugerir que *Botropoidina* é uma  $\alpha$ -fibrinogenase hemorrágica capaz de contribuir significativamente para a toxicidade do envenenamento por *Bothrops pauloensis*.

Palavras Chaves: *Bothrops pauloensis; metaloprotease hemorrágica; MS (espectrometria de massa); células tEnd; agregação plaquetaria.*

## **Abstract**

In the present work, we demonstrate the biochemical and functional characterization of *Bothropoidin*, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. This protein was purified after three chromatographic steps on CM-Sepharose fast flow, HiTrep Sephadryl S-300 RP and HiTrep Capto Q. *Bothropoidin* was homogeneous by SDS-PAGE under reducing and nonreducing conditions, and was shown to present a single chain of 49,558 Da by MALDI TOF analysis. The protein presented isoelectric point of 3.76 and the sequence of two fragments obtained by *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) in MS (MALDI TOF\TOF) showed significant score when compared with another SVMPs. This enzyme showed proteolytic activity upon azocasein, Aα-chain of fibrinogen, fibrin, collagen and fibronectin. The enzyme was stable at pH between 6-9 and lower temperatures when assayed on azocasein. Moreover, this activity was inhibited by EDTA, 1,10-phenanthroline and β-mercaptoethanol. This enzyme acted on blood clotting altering the aPTT and PT. *Bothropoidin* was able to induce hemorrhage (MHD=0.98 µg) and necrosis in the gastrocnemius muscles of mice, showing high toxicity. The protein was capable of inhibiting platelet aggregation induced by collagen and ADP and interfered with viability and cell adhesion when incubated with tEnd endothelial cells in a dose dependent manner. Taken together, these results lead us to suggest that *Bothropoidin* is a hemorrhagic α-fibrinogenase which can contribute significantly to the toxicity of *Bothrops pauloensis* envenomation.

**Keywords:** *Bothrops pauloensis*; hemorrhagic metalloproteinase; MS: mass spectrometry; platelet aggregation; tEnd cells.

## **1. Introdução**

Animais peçonhentos são aqueles que produzem a peçonha em tecidos ou glândulas especializadas, e geralmente possuem um aparelho inoculador desta secreção. Entre os diferentes tipos de peçonhas, as produzidas pelas serpentes destacam-se como as mais estudadas. Em uma recente pesquisa realizada no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) encontra-se, somente na última década, mais de 4.500 publicações relacionadas com as toxinas provenientes das peçonhas de serpentes. Isso porque essas peçonhas possuem uma grande variabilidade de proteínas e peptídeos biologicamente ativos que despertam interesse tanto no que diz respeito ao conhecimento da sua participação na fisiopatologia do envenenamento, bem como em uma possível aplicação terapêutica para alguns de seus componentes isolados.

De acordo com Sajevic et al., (2011), no mundo são catalogadas mais de 3.000 espécies de serpentes, dentre as quais cerca de 20% são peçonhentas. No Brasil estas serpentes encontram-se nas famílias Viperidae e Elapidae. Com base na reclassificação recente proposta pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH) as serpentes brasileiras pertencentes à família Viperidae são responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos registrados, representando assim quase a totalidade dos acidentes ofídicos. Estas espécies compreendem os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* com ocorrência em todo o território nacional.

Os acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae) são caracterizados por apresentarem importantes ações fisiopatológicas, tais como: atividade proteolítica, ação coagulante e/ou anticoagulante, necrose, edema, hemorragia local e sistêmica. Estas manifestações estão associadas principalmente à ação de enzimas tais como fosfolipases A<sub>2</sub>, serinoproteases e metaloproteases. Estas enzimas possuem múltiplos alvos e o sinergismo entre elas potencializam a toxicidade observada no envenenamento (Gutiérrez et al., 2009, Sajevic et al., 2011).

As metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMPs) estão entre os componentes mais encontrados nas peçonhas botrópicas e a sua diversidade estrutural lhes confere a capacidade de interferir em diversos sistemas celulares. De modo geral, o mecanismo de ação das SVMPs está relacionado à proteólise

de componentes da matriz extracelular (Gutiérrez et al., 2005), proteínas plasmáticas (Silva et al., 2003; Escalante et al., 2011, Sajevic et al., 2011), proteínas de membrana celular (Kamiguti et al., 2003) e à interação com receptores específicos, como integrinas de superfície de plaquetas (De Luca et al., 1995; You et al., 2006), células endoteliais (Souza et al., 2000; Cominnetti et al., 2004) e fibroblastos (Zigrino et al., 2002), ativando ou inibindo a resposta celular. Esses efeitos podem resultar em várias alterações fisiopatológicas tais como hemorragia, inflamação, inibição da agregação plaquetária e apoptose (Gutiérrez et al., 2005, Moraes & Selistre, 2006, Lopes et al., 2009, Brenes et al., 2010, Tanjoni et al., 2010, Sajevic et al., 2011).

As SVMPs são membros do clan Metzincin, portanto são zinco dependentes. Estas contêm um motivo conhecido como *Met-turn* que apresenta uma metionina ( $\beta$ -turn) em sua estrutura terciária que se liga ao sítio catalítico de zinco (HExxHxxGxxH.....M), juntamente com as proteínas reprodutivas de mamíferos as ADMA<sub>s</sub> (**A Disintegrin and Metaloproteinases**) são membros da subfamília Reprolisinases. As SVMPs são sintetizadas como pró-enzimas (zimogênios) na glândula especializada e quando processados liberam um peptídeo cuja sequência conservada (**PKMCGVT**) liga-se ao zinco, e dessa forma inibe a sua atividade catalítica, mecanismo este conhecido como "Cysteine-switch" (Grams et al., 1993; Bjarnason & Fox, 1995; Fox & Serrano, 2005; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006).

Bjarnason e Fox (1994) foram pioneiros na classificação das SVMPs, para tal utilizaram como parâmetro a atividade hemorrágica e a massa molecular. Neste trabalho às metaloproteases foram divididas em diferentes classes (P-I, P-II, P-III e P-IV). A classe P-I representa as SVMPs de baixa massa molecular e que apresentam apenas o domínio metaloprotease, podendo ser fracamente hemorrágicas ou não hemorrágicas, no entanto todas elas apresentam elevada atividade proteolítica sobre diversos substratos. Como exemplo desta classe de metaloprotease pode-se citar *Neuwiedase* de *Bothrops neuwiedi* (Rodrigues et al. 2000), *BpMP-I* de *Bothrops pauloensis* (Naves de Souza et al., 2012), *BmooMPa-I* de *Bothrops moojeni* (Bernades et al., 2008). Estas enzimas são fibrinogenolíticas e não hemorrágicas, no entanto alguns representantes dessa

classe são fibrinogenolíticas e fracamente hemorrágicas, como as metaloproteases *CcH1* de *Cerastes cerastes* (Boukhalfa-Abib et al., 2009) e *BthMP* de *Bothrops moojeni* (Gomes et al., 2009).

A classe P-II é composta por proteínas de massa molecular intermediária, apresentam além do domínio metaloprotease o domínio desintegrina contendo a sequência tripeptídica RGD que interage com integrinas existentes nas membranas das plaquetas, por isto estas enzimas são inibidoras de agregação plaquetária. Exemplos dessa classe são a *Bothrostatin* de *Bothrops jararaca* (Fernandes et al., 2005) e *Stejnitin* de *Trimeresurus stejnegeri* (Han et al., 2007). Entre outras ações importantes, estas enzimas contribuem para o aumento das desintegrinas nas peçonhas das serpentes; tendo em vista que elas podem sofrer autólise e assim liberam o domínio metaloprotease e desintegrina livres.

As SVPMs da classe P-III são as que apresentam alta massa molecular e exibem elevada atividade hemorrágica; além disto, essas enzimas são capazes de degradar componentes da membrana basal e interferir na agregação plaquetária, entre outras ações importantes. Esta classe enzimática é estruturalmente formada pelo domínio metaloprotease, um domínio tipo desintegrina e o domínio rico em cisteína. Como exemplos a *Jararagina* de *Bothrops jararaca* (Paine et al., 1992) e *VLH2* de *Vipera lebetina* (Hamza et al., 2010). Na classe P-IV encontram-se as SVMPs de massa molecular acima de 90 kDa e que não apresentam atividade hemorrágica, estruturalmente elas contêm todos os domínios presentes nas SVMPs da classe P-III com a adição de um domínio lectina tipo-C conectado por pontes dissulfeto. São poucas as enzimas caracterizadas desta classe, como a *VLFXA* um ativador de fator X isolado de *Vipera lebetina* (Siigur et al., 2001).

Em 2008, Fox e Serrano propuseram uma nova classificação para as SVMPs. Nesta nova proposta tomou-se como base estudos dos precursores das SVMPs, assim como dos produtos gerados por modificações pós traducionais. Com esta nova proposta surgiram várias subclasses (P-Ia, P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId, P-IIe, D-I, P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc e P-IIIId). Nesta reclassificação foram incorporadas as metaloproteases diméricas, desintegrinas livres, desintegrinas diméricas, desintegrinas provenientes de autólises das metaloproteases, domínios

disintegrin-like/cysteine-rich (D/C). As metaloproteases da classe P-IV foram incorporadas em uma nova subclasse denominada P-IIId, tendo em vista que até o presente momento não foram identificados mRNAs que traduzam todos os domínios presentes neste tipo de proteína. Assim foi sugerido que estas proteínas ocorrem na peçonha por modificação pós tradicional das metaloproteases da classe P-III.

A espécie *Bothrops pauloensis* é proveniente do antigo complexo *Bothrops neuwiedi*, ocorre no Brasil nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná. Esta espécie é endêmica na região do Triângulo Mineiro, sudoeste do Estado de Minas Gerais (Silva & Rodrigues, 2008, Valle & Brites, 2008).

O estudo do proteoma dessa peçonha, aliado às análises do transcriptoma da glândula venenífera revelaram a presença de muitos peptídeos e proteínas ainda não isolados e caracterizados quanto à estrutura e função nessa peçonha, incluindo metaloproteases (Rodrigues et al., 2012). O isolamento e a caracterização estrutural e funcional de metaloproteases presentes na peçonha de *Bothrops pauloensis* são importantes para a continuidade de estudos que tentam compreender melhor a relação estrutura-função destes componentes bem como sua ação sobre a hemostasia e seus possíveis potenciais clínicos e ou biotecnológicos. Com esse intuito o presente trabalho teve como objetivo avaliar os aspectos bioquímicos e funcionais de uma metaloprotease hemorrágica isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, denominada *Botropoidina*.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Animais e Peçonha**

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c foram mantidos em condições padrão de luz (ciclo de 12h luz/12h escuro em temperatura ambiente) no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com água e suplemento alimentar “ad libitum”. Os cuidados com os animais foram conduzidos de acordo com as orientações do

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sendo aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (Protocolo nº 046/09 – CEUA/UFU).

A peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* foi obtida no Serpentário Bioagentes, Batatais, São Paulo, Brasil. Após a coleta, a peçonha foi liofilizada e armazenada -20 °C, no laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais (LQPPN) da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG). O plasma bovino citratado foi gentilmente cedido pelo Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG).

## **2.2 Reagentes**

Resinas cromatográficas CM-Sepharose fast flow, Sephadex S-300 RP, HiTrep Capto Q, C2C18 foram obtidas da GE Healthcare Bio-Sciences.

Os reagentes, acrilamida, aprotinina, azocaseína, azul de bromofenol, benzamidina, bicarbonato de amônio, bis-acrilamida, colágeno tipo IV, coomassie G, coomassie R-250, EDTA, fibrinogênio bovino, fibronectina, TEMED, PMSF, persulfato de amônio, soroalbumina, trombina humana, foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Os substratos p-nitroanilida (S-2238) H-D-Phe-pipocolyl-Arg-pNA.2HCl; (S-2222) N-Bz-Ile-Glu-(OR)-Gly-Arg-pNa.HCl; (S2251) H-D-Val-Leu-Lys-pNA.2HCl e (S-2302) H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl, foram obtidos da Chromogenix.

Todos os outros reagentes químicos utilizados eram de elevado grau de pureza analítica.

## **2.3 Isolamento da metaloprotease hemorrágica de *Bothrops pauloensis***

A metaloprotease foi isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* utilizando-se três passos cromatográficos.

### **2.3.1 Cromatografia de troca iônica CM-Sepharose fast flow**

Inicialmente, cerca de 200mg da peçonha de *Bothrops pauloensis* foi dissolvido em 2 mL de bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05M, pH 7,8 e centrifugados a 1000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi aplicado em uma

coluna cromatográfica (1,4 x 26 cm) contendo a resina CM-Sepharose fast flow a qual foi previamente equilibrada com o mesmo tampão AMBIC 0,05M, pH 7,8. A eluição da amostra foi realizada com um gradiente linear de concentração contínuo de 0,05M a 0,5M do tampão AMBIC, pH 7,8. Foram coletadas frações de 1,0 mL por tubo, em um fluxo de 6,6 mL/hora, a temperatura de 25ºC. As frações obtidas (CM1-CM6) foram monitoradas a 280nm em espectrofotômetro Ultrospec 1000 UV/visível (Pharmacia Biotech). As frações foram reunidas, liofilizadas e armazenadas à -20ºC.

### **2.3.2 Cromatografia em gel filtração HiPrep Sephacryl S-300**

A fração CM1 com atividade azocaseinolítica e hemorrágica foi coletada, congelada, liofilizada e posteriormente ressuspensida em 1,5mL de tampão AMBIC 0,05M, pH 7,8 e aplicada em uma coluna HiPrep Sephacryl S-300 (26/60) previamente equilibrada pelo mesmo tampão. Neste passo cromatográfico foram coletadas frações de 2,0 mL/tubo, a um fluxo de 12 mL/hora. As frações obtidas (S1-S7) foram monitoradas automaticamente por leitura de Abs a 280nm, utilizando um aparelho AKTA Prime Plus (GE Healthcare Bio-Sciences). A fração (S1) com atividade hemorrágica foi reunida, liofilizada e submetida à etapa cromatográfica a seguir.

### **2.3.3 Cromatografia de troca iônica em HiTrap Capto Q**

A fração S1 foi ressuspensida em 1,5 mL de tampão AMBIC 0,05M, pH 7,8 e aplicada em três colunas acopladas (1 mL cada) HiTrap Capto Q previamente equilibrada com o mesmo tampão e eluída utilizando um gradiente linear de AMBIC 0,05M a 0,5M, pH 7,8. Neste passo cromatográfico foram coletadas frações de 1,0 mL/tubo, a um fluxo de 6 mL/hora. A fração Q2 obtida neste passo de purificação mostrou alta atividade hemorrágica e uma banda única em SDS-PAGE a 13,5%. Esta fração, nomeada de *Botropoidina*, foi congelada, liofilizada e estocada à -80 ºC para análises posteriores.

### **2.3.4 HPLC de fase reversa**

A metaloprotease *Botropoidina* obtida na etapa cromatográfica anterior foi submetida a cromatografias de fase-reversa em um sistema de cromatografia líquida de fase reversa de alta performance (RP-HPLC) em coluna µRPC C2C18 de 4.6x150mm (GE Healthcare Bio-Sciences). Amostras da metaloprotease (200µg) foram preparadas em 500 µL de solvente (0,1% ácido trifluoracético-TFA) e aplicadas no sistema RP-HPLC usando uma coluna equilibrada com solvente A (0,1% ácido trifluoracético, v/v e acetonitrila 5%, v/v) e eluída com o solvente B (acetonitrila 80%, v/v e ácido trifluoracético 0,1%, v/v). Esta cromatografia foi realizada com o gradiente de concentração linear de 0 to 100% do solvente B a um fluxo de 0,5 mL/min.

## **2.4. Caracterização bioquímica e estrutural**

### **2.4.1 Determinação da concentração proteíca.**

As dosagens de proteínas em soluções foram realizadas utilizando o método estabelecido por Bradford (1976). As determinações das concentrações de proteínas foram realizadas em triplicatas e a absorbância medida a 595nm. Paralelamente à dosagem de proteínas foi construída uma curva padrão de soroalbumina bovina (1mg/mL), considerando o coeficiente de extinção molar em 280nm (0,665). A concentração de proteínas em µg/µL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

### **2.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)**

As frações cromatográficas e a metaloprotease isolada foram analisadas em gel de poliacrilamida a 13,5% (m/v) em condições redutoras, na presença de SDS e β-mercaptoeanol, e não redutoras na ausência de β-mercaptoetanol, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu de: gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% (m/v) e gel de separação a 13,5% contendo Tris-HCl 2,0M pH 8,8 e SDS 0,1% (m/v), mantendo a relação de bis:acrilamida 0,8:30. Todos os

géis foram preparados num sistema de eletroforese *Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical*.

As amostras foram dissolvidas em um tampão de Tris-HCl 0,06 M pH 6,8; SDS 2% (m/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); azul de bromofenol 0,005%(m/v) e glicerol 10% (v/v). Em seguida as amostras foram aquecidas por 5 minutos a 100°C. O tampão do eletrodo continha Tris 0,025M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v), pH 8,3. O gel foi corado em solução de coomassie blue- R250 0,1% (m/v) em água, ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v) e descorado em solução de ácido acético a 7% (v/v) e etanol 30% (v/v) para posterior análise.

A massa molecular da metaloprotease isolada foi estimada pela interpolação de uma curva logarítmica linear da massa molecular relativa das proteínas do padrão de massa molecular versus a distância de migração no gel. O padrão de massa molecular consistia nas proteínas: Albumina Bovina (66 kDa); Ovoalbumina (45 kDa); Anidrase carbônica (29 kDa); Tripsinogênio (24 kDa); β-lactoglobulina (18,4 kDa); α-lactoalbumina (14,2 kDa).

#### **2.4.3. Determinação da massa molecular por MALDI-TOF MS**

A massa molecular da metaloprotease *Bothropoidin* também foi determinada por espectrometria de massas com ionização e dessorção de matriz assistida por laser (MALDI-TOF-MS) (*Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry*).

As análises foram feitas em espectrofotômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF, modelo AutoFlex III Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha)

Amostras da metaloprotease (5 µg) foram diluídas em 50µL de água Milli-Q e misturadas na proporção 1:1 (v/v) com a matriz composta de ácido sinapílico 10 mg/mL em acetonitrila 50% e TFA 0,1%, e aplicadas na placa do MALDI. Os espectros de massa foram adquiridos no modo linear positivo, após calibragem do aparelho com padrões de proteínas (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A faixa de massas moleculares avaliada foi de 3.000-80.000 m/z.

#### **2.4.4. Focalização Isoelétrica**

A focalização isoelétrica da proteína foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). Cerca de 25 $\mu$ g de proteína foi ressuspendida em 125 $\mu$ L de tampão de reidratação (ureia 7M, thiouréia 2M, 2% CHAPS (m /v), DTT 10mM, azul de bromofenol 0,002%), contendo também tampão *IPG* 0,5% (v/v), pH 3-10 (GE Healthcare). As tiras de poliacrilamida (7cm de comprimento) com gradiente de pH imobilizado (pH de 3 a 10) foram reidratadas no sistema *IPGbox* durante 16 horas. Posteriormente, foi realizada a focalização isoelétrica das fitas no sistema Ettan IPGphor 3 com o seguinte programa: 200 V/1h, 3000 V/1h, 4000V/1h, 1250V/h e 50V por 1h.

Entre a primeira e a segunda dimensão, as tiras focalizadas foram equilibrada em 10 mL de solução Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, ureia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,002% (m/v) contendo 10 mg/mL de ditiotreitol (DTT), durante 15 minutos. Em seguida, foi realizado um segundo equilíbrio utilizando a mesma solução adicionada 25 mg/mL iodoacetamida por 15 minutos. Após o processo de equilíbrio, as tiras foram submetidas a *SDS-PAGE* 12.5% no sistema de eletroforese Mini VE (GE Healthcare), tal como descrito pelo fabricante, e o gel foi corado com Coomassie G-250 a 2% (m/v.)

O gel foi escaneado em scanner de imagens (GE Healthcare), usando *Image Master LabScanTM v Programa 5.0*, com uma resolução de 300 dpi. A análise foi realizada por Imagem *Platinum 2D Mestre v* (GE Healthcare).

#### **2.4.5. Espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF) e Bioinformática**

Cerca de 80  $\mu$ g da metaloprotease *Botropoidina* foi solubilizada em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM e Ureia 8 M, durante 20 min. Esta mistura foi submetida a redução com DTT 10 mM em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, a 37 ° C durante 60 min. Para alquilação, foram adicionados 50 mM de iodoacetamida em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM a 37 °C durante 30 min. Uma alíquota de tripsina Gold 0.5 $\mu$ g/2.5 $\mu$ L (Promega, Madison, WI, EUA) foi adicionada para prosseguir a digestão a 37 °C durante à noite. A reação foi interrompida pela adição de TFA a 1% e a mistura de fragmentos obtidos da digestão com a tripsina foram concentrados em *Speed-Vac* (Savant SPD121P). A mistura de peptídeos foi dessalinizada utilizando um

cartucho *C18* acoplado ao sistema HPLC. Para cada análise, 1 $\mu$ L da amostra foi adicionado a 3 $\mu$ L da matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico ( $\alpha$ -CHCA), e posteriormente 1,0  $\mu$ L desta mistura foi aplicado sobre uma placa (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e seca à temperatura ambiente.

Análise por espectrometria de massa foi realizada por MALDI TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) utilizando um dispositivo Autoflex III MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, EUA), controlada pelo *software FlexControl 3.1* (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). O *software Flex 3,3* (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) foi utilizado para a análise de dados de espectrometria de massa. As massas peptídicas monoisotópicas foram obtidas em modo refletor com calibração externa, utilizando-se um padrão de calibração de peptídeos (Bruker Daltonics, Billerica, EUA). Espectros de peptídeos (MS/MS) foram realizados pela fragmentação LIFT. Os espectros de massa foram analisados com o *software Biotools* (Bruker Daltonics) e a identificação da proteína foi realizada com o *software Mascot* (Perkins et al., 1999). As pesquisas foram obtidas no banco de dados NCBI (Johnson et al., 2008).

As sequências homólogas foram obtidas a partir do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>- acessado em 04/12/2012) usando o algoritmo BLASTP e as sequências dos fragmentos obtidos por LC-MS/MS como sequência de consulta. Para alinhamento das sequências depositadas com os fragmentos obtidos foi utilizado o programa ClustalW (Larkin et al., 2007).

## **2.5 Caracterização Enzimática**

### **2.5.1 Atividade proteolítica sobre a azocaseína**

Para a realização da atividade azocaseinolítica foi utilizado o substrato sulfanilamida-azocaseína (*Sigma-Aldrich*). Amostras contendo 5 $\mu$ g de proteínas foram incubadas com 400  $\mu$ L da solução de azocaseína (1.5 mg/mL) em Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, contendo CaCl<sub>2</sub> 5mM por 60 min. a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 100 $\mu$ l de ácido tricloro acético a 10% (v/v). A mistura permaneceu em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos e posteriormente foi centrifugada por 15 minutos a 5.000xg. 200  $\mu$ l do sobrenadante

foram retirados e a quantificação da atividade proteolítica foi realizada em microplaca a 405nm utilizando uma leitora de Elisa (*BioTeK – Elx50*). Uma unidade (U) de atividade azocaseinolítica foi definida como sendo o acréscimo de 0,01 unidades de absorbância a 405nm em relação às condições do ensaio controle. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

O efeito de agentes quelantes, inibidores de proteases e de íons metálicos bivalentes também foi testado utilizando a atividade azocaseinolítica; Para tais estudos, 5 µg de *Botropoidina* foram pré-incubados por 1 h à 37ºC com 10 µL de soluções de EDTA 10 mM, 1,10-fenantrolina 10 mM, PMSF 10mM, aprotinina 10 mM e β-mercaptoethanol 10mM, ou com soluções de íons metálicos bivalentes (CaCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> e HgCl<sub>2</sub>) à 10 mM. Posteriormente ao período de incubação, a atividade proteolítica foi avaliada conforme descrito anteriormente.

### **2.5.2. Estabilidade enzimática quanto a variação de pH e Temperatura**

Para a análise da estabilidade da enzima frente à variação de pH e temperatura, utilizou-se a metodologia da atividade azocaseinolítica. Amostras contendo 5 µg de *Botropoidina* foram pré-incubados por 30 minutos à 37ºC em soluções tampão com pH variando de 3,0 a 11.

A temperatura ótima foi determinada pré-incubando a mesma quantidade da protease por 30 minutos em diferentes temperaturas (variando de 20 a 80ºC). Imediatamente após o tempo de incubação a atividade azocaseinolítica foi realizada como descrita no item 2.5.1.

### **2.5.3 Atividade Fibrinogenolítica**

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi realizada como descrito por Rodrigues et al. (2000), com modificações. Amostras contendo 50µL de uma solução de fibrinogênio bovino (1.5 mg/mL) em Tris-HCl 50mM, pH7.4 e CaCl<sub>2</sub> 5mM, foram pré-incubadas com 5 µg de *Botropoidina* a 37ºC em diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos). A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 6,5 contendo SDS 2% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v).

Em seguida a solução foi aquecida a 100ºC por 5 minutos e o produto da reação foi analisado em *SDS-PAGE* a 13,5%, conforme descrito no item 2.4.2.

#### **2.5.4. Atividade proteolítica sobre a fibrina**

A atividade proteolítica sobre a fibrina foi ensaiada utilizando uma solução de 2,0 mg/mL de fibrinogênio bovino dissolvido em Tris-HCl 50mM, pH 7.4, contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Em 50µL desta solução foram adicionados 10 NIH units/mL de trombina humana (*Sigma-Aldrich*), mantidos em repouso a temperatura ambiente por 2 horas para a formação do coágulo de fibrina. Após a formação da fibrina, a solução foi tratada com 10µL (5µg) da protease *Botropoidina* dissolvida no mesmo tampão e incubada por diferentes intervalos de tempo (2, 4, 6, 12 horas) a 37ºC. Após cada intervalo de tempo a reação foi imediatamente interrompida pela adição de 10µL de tampão Tris-HCl 50mM pH 6,5 contendo SDS 2% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). Os produtos de degradação foram analisados em *SDS-PAGE* a 13,5 % conforme descrito no item 2.4.2.

#### **2.5.5 Degradação de proteínas da matriz extracelular**

A atividade proteolítica da metaloprotease *Botropoidina* sobre proteínas da matriz extracelular foi investigada de acordo com a metodologia descrita por Kumar et al., (2010), com algumas modificações. Amostras contendo 50µL de solução de fibronectina (1mg/mL) e colágeno tipo-IV (2.5mg/mL) foram misturados com 5µg da protease em 10µL de Tris-HCl 50mM, pH 7.4 contendo 5mM de CaCl<sub>2</sub> e incubados a 37ºC por diferentes intervalos de tempo ( 2, 4 e 6 horas). A reação foi interrompida pela adição de 10µL de tampão Tris-HCl 50mM pH 6,5 contendo SDS 2% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). Os produtos de degradação foram analisados em *SDS-PAGE* a 7.5% conforme descrito no item 2.4.2.

### **2.5.6. Atividade sobre substratos cromogênicos**

A capacidade da protease *Botropoidina* em hidrolisar os substratos cromogênicos S-2238 0,1mM (substrato para enzima *thrombin-like*); S-2222 0,4 mM (substrato para fator Xa); S-2302 0,3mM (substrato para calicreina plasmática); S-2251 0,3mM (substrato para plasmina) foi realizada incubando-se 200 $\mu$ L de cada substrato dissolvidos em Tris-HCl 50mM, pH 7,4 contendo 5mM de CaCl<sub>2</sub> e 1,0 ou 2,0  $\mu$ g da enzima dissolvidos no mesmo tampão para um volume final de reação de 250 $\mu$ l. A solução foi incubada por 20 minutos a 37°C e posteriormente a Abs foi determinada a 405nm utilizando leitora de microplacas (*BioTeK – Elx50*). Como controle foram utilizados 200  $\mu$ L da solução de cada substrato com a adição de 50 $\mu$ l de Tris-HCl 50mM, pH 7,4 contendo 5mM de CaCl<sub>2</sub>. O acréscimo de 0.01 Abs a 405nm foi considerado como uma unidade de atividade. Os testes foram realizados em triplicata.

## **2.6 Caracterização Funcional**

### **2.6.1. Atividade hemorrágica e determinação da dose mínima hemorrágica**

A atividade hemorrágica foi realizada para a determinação da dose mínima hemorrágica (DMH) e também para monitorar as frações em todos os passos cromatográficos. Esta atividade foi realizada segundo Nikai et al. (1984) com algumas modificações. Foram utilizados camundongos Balb-C machos de 18-20g divididos em grupos (n=5). Os animais receberam injeções intradérmica no dorso contendo amostras peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* (2  $\mu$ g, 4 $\mu$ g e 6  $\mu$ g) ou *Botropoidina* (1 $\mu$ g, 2  $\mu$ g e 4  $\mu$ g) dissolvidos em 50  $\mu$ l de PBS. Animais controle receberam 50  $\mu$ l de PBS. Após 3 horas de inoculação, os animais foram anestesiados com ketamina® 10% (0,05ml/kg) + xilasina® 2% (0,025ml/kg), sacrificados por deslocamento cervical, as peles removidas e o diâmetro do halo hemorrágico na superfície interna da pele foi determinado com o auxílio de paquímetro digital. A DMH foi calculada com base na equação obtida pelos valores de diâmetro dos halos hemorrágicos. A DMH corresponde à menor dose capaz de produzir uma lesão hemorrágica de 10 mm<sup>2</sup>.

A inibição da atividade hemorrágica também foi testada pré incubando a toxina por 1 h a 37ºC com 10 µL de solução de EDTA 1 mM ou 10 mM.

#### **2.6.2. Ensaio de incoagabilidade sanguínea**

A capacidade da protease em provocar incoagabilidade sanguínea foi testada pelo método descrito por Gene et al., (1989), com algumas modificações. Foram utilizados grupos de cinco camundongos Balb-C (18-20g). Os animais receberam injeções intraperitoneal contendo 5µg de *Botropoidina* dissolvida em 50µL de PBS. Os animais controle receberam apenas 50µL de PBS. Após 3 horas de inoculação, os animais foram anestesiados com ketamina® 10% (0,05ml/kg) + xilasina® 2% (0,025ml/kg) e sacrificados por deslocamento cervical. Imediatamente o sangue foi coletado por punção cardíaca e transferido para tubos de ensaio de vidro mantidos a temperatura ambiente para observar a capacidade de coagulação.

#### **2.6.3. Atividade coagulante sobre o plasma**

A atividade coagulante foi ensaiada sobre o plasma bovino citratado. Amostras de 5µg de *Botropoidina* dissolvidas em 15µL de Tris-HCl 50mM pH 7.4, contendo 5mM de CaCl<sub>2</sub> foram incubadas com 200µL do plasma bovino citratado. Os testes foram realizados em um aparelho coagulômetro microprocessador *Quick-Timer* (DRAKE LTDA). Este aparelho detecta os primeiros traços da formação do coágulo por um sistema óptico. Os testes foram realizados com n=5.

#### **2.6.4. Determinação do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)**

Para determinar a capacidade da *Botropoidina* em interferir nos parâmetros da coagulação sanguínea (TP e TTPa), grupos de 5 animais (Balb-C, 18-20g,) foram injetados com 5µg/50µL em PBS da protease por via intraperitoneal (i.p.). Os animais controle receberam somente 50µL de PBS. Após 3 horas de inoculação os animais foram anestesiados com ketamina® 10% (0,05ml/kg) + xilasina® 2% (0,025ml/kg), sacrificados por deslocamento cervical e o sangue coletado por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado por 360xg durante 15

minutos a 4°C e o plasma obtido foi utilizado para determinar o TP e TTPa com base na metodologia descrita no kit comercial “CLOT Produtos e Equipamentos para Coagulação” ([www.clot.com.br](http://www.clot.com.br)). Os testes (n=5) foram realizados em um aparelho coagulômetro microprocessador *Quick-Timer* (DRAKE LTDA).

### **2.6.5 Agregação Plaquetária**

Este teste foi realizado como descrito por Moura-da-Silva *et al.*, (2008), com algumas modificações. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado a partir do sangue bovino citratado e posteriormente centrifugado a 360xg por 15 minutos a temperatura ambiente. O PRP foi diluído em 0,1% de EDTA e centrifugado durante 20 minutos a 850xg. O precipitado de plaquetas foi ressuspenso em solução *Tyrode*, contendo: soroalbumina bovina (BSA) 0,35% (m/v) e EDTA 0,1 mM. Esta mistura foi lavada duas vezes por centrifugação. O precipitado final de plaquetas foi ressuspensionado em solução Tyrode-BSA, pH 7,5. A suspensão de plaquetas foi ajustada para dar uma concentração de  $3\text{-}4 \times 10^5$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ . Para a realização dos testes a toxina (5 $\mu\text{g}$ ) foi pré-incubada com 200 $\mu\text{L}$  da solução final de plaquetas por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 25 $\mu\text{L}$  de solução dos agonistas (colágeno 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e ADP 5mM). Os testes foram realizados a 37°C e a agregação plaquetária foi determinada por 5 minutos em um agregômetro *Agg RAM* (Remote Aggregation Analyzer). Como controle foi utilizado somente colágeno e ADP sobre a solução de plaquetas.

### **2.6.6 Estudo do efeito miotóxico da *Botropoidina* e da peçonha de *Bothrops pauloensis* em músculo gastrocnemio utilizando-se duas condições:**

#### **a) Atividade miotóxica analisada por dosagem de creatina cinase no plasma**

Grupos de três camundongos Balb-c machos (20-25 g) foram injetados intramuscularmente no músculo gasctrocnêmio direito com doses de 5  $\mu\text{g}$  da peçonha ou 5 $\mu\text{g}$  da *Botropoidina* em 50  $\mu\text{l}$  de PBS. Animais controle receberam apenas 50 $\mu\text{L}$  de PBS. Após 3 horas de inoculação os animais foram anestesiados

com (ketamina® 10% (0,05ml/kg) + xilasina® 2% (0,025ml/kg) e sacrificados por deslocamento cervical. O sangue coletado por punção cardíaca foi centrifugado a 2.500 x g por 10 minutos a 4°C. A quantificação dos níveis de creatina cinase (CK-EC. 2.7.3.2) no plasma obtido foi determinada utilizando a metodologia descrita no Kit CK-UV kinetic (BIOCLIN).

#### **b) Alterações Morfológicas**

As alterações morfológicas induzidas por 5µg de *Botropoidina* ou 5µg da peçonha em 50µL de PBS foram analisadas pela injeção intramuscular (i.m.) no músculo gastrocnêmio de camundogos Balb-c machos (20-25g). Os animais controle receberam apenas 50µL de PBS. Após 24 horas de inoculação os animais foram anestesiados com ketamina® 10% (0,05ml/kg) + xilasina® 2% (0,025ml/kg) e sacrificados por deslocamento cervical. Uma pequena parte da região central do músculo gastrocnêmio foi extraída e conservada em solução fixadora (formaldeído a 10% em PBS, v/v). O material foi desidratado por concentrações crescentes de etanol e processados para inclusão em parafina. Os blocos resultantes foram cortados em secções de 2,5 µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina 0,25% (v/v), examinados em microscópio óptico e fotografados.

#### **2.6.7 Cultura de células**

Neste trabalho foram utilizadas células endoteliais murinas na linhagem tEnd (Thymic endothelium), estabelecida por Bussolino et. al. (1991). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 acrescido com 10% de soro fetal bovino e suplementado com 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, mantidas em estufa 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.6.8 Viabilidade e adesão celular**

A viabilidade e adesão celular de culturas de células tEnd tratadas com a *Botropoidina* foram quantificadas pela atividade da succinil desidrogenase, uma enzima mitocondrial presente somente em células vivas, cujo o substrato é o

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Para determinar a viabilidade e adesão celular,  $2 \times 10^4$  células/poço foram semeadas em microplacas de cultura de 96 poços. Após a adesão, o meio foi trocado e as células foram tratadas com diferentes concentrações de *Botropoidina* (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 e 0.625 µg/mL) por um período de 24 horas. Culturas tratadas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. Para determinar a viabilidade celular, após 6 e 24 horas de incubação, foram adicionados diretamente sobre o meio de cultura 20µL de uma solução contendo 5mg/mL de MTT e a cultura mantida à 37°C por 3h. Após este período, foram adicionados 100µL de uma solução de SDS 10%/HCl 0,01M durante um período de 18h. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da densidade óptica a 570 nm em um leitor de ELISA (BioTeK – Elx50). Para avaliar a adesão celular, os poços foram lavados por duas vezes com PBS antes do estabelecimento do mesmo protocolo descrito para a determinação da viabilidade celular. O experimento foi realizado em triplicata.

### **2.7 Análise estatística dos resultados**

A montagem dos gráficos, cálculos das médias e desvios padrões das médias foram realizados com auxílio do software Prisma. Significâncias estatísticas dos resultados foram determinadas utilizando o teste t-Student's. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### **3. Resultados e discussão**

Metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs) são hidrolases do tipo endopeptidases (E.C.3.4.24) e constituem uma família de proteases que apresentam uma diversidade de ações biológicas, entre as quais destacam-se a ação proteolítica sobre diversos substratos, tais como: fibrinogênio, fibrina, componentes da membrana basal e matriz extracelular. Essas enzimas também causam hemorragia local e sistêmica, mionecrose, inibição da agregação plaquetária, entre outros. Tais ações podem contribuir significativamente para a

patogênese do envenenamento (Gay et al., 2009, Baldo et al., 2010, Brenes et al., 2010, Escalante et al., 2011, Sajevic et al., 2011).

Estudos de venômica têm demonstrado que as SVMPs ocorrem em larga escala nas peçonhas de serpentes da família Viperidae (entre 40-50%, na maioria dos estudos encontrados na literatura) (Ching et al., 2006, Tashima et al., 2008, Neiva et al., 2009, Zenalis et al., 2012). Segundo estudo realizado por Rodrigues et al., 2012, na peçonha da serpente de *Bothrops pauloensis*, das proteínas biologicamente ativas, 38% são metaloproteases.

Neste trabalho demonstrou-se a purificação e caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease hemorrágica da peçonha de *Bothrops pauloensis*. A protease foi obtida após três passos cromatográficos, a saber: Inicialmente 125 mg (dosado) da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foi fracionada em coluna cromatográfica contendo a resina de troca iônica CM-Sepharose fast flow. Nesta cromatografia foram obtidas seis frações principais (CM1 a CM6) (Fig. 1A), as quais foram testadas quanto às atividades proteolíticas sobre a azocaseína e hemorrágica. A fração CM1 apresentou maior atividade hemorrágica e mostrou-se bastante heterogênea quando analisada em SDS-PAGE (resultados não apresentados).

A fração (CM1) foi liofilizada e submetida à cromatografia em resina de gel filtração HiPrep Sephadryl S-300 (26/60). Este segundo passo cromatográfico produziu 7 frações denominadas S1 a S7(Fig. 1B). A fração S1 mostrou ser constituída por proteínas de elevada massa molecular (resultados não apresentados), apresentou atividade proteolítica sobre a azocaseína e atividade hemorrágica (Tabela I e Fig1B, respectivamente). Esta fração foi liofilizada e em seguida aplicada em uma resina de troca iônica HiTrep Capto Q. A fração Q2 obtida da última cromatografia (Fig. 1C) demonstrou atividade hemorrágica, atividade proteolítica sobre a azocaseína e uma única banda em SDS-PAGE a 13,5% em condições redutoras e não redutoras apresentando um único componente com massa molecular estimada de 52kDa e 48,8kDa, respectivamente, mostrando ser formada por uma única cadeia polipeptídica (Fig. 2A). A diferença entre as massas moleculares da proteína reduzida e não reduzida é explicada pelo fato do agente redutor romper as ligações dissulfeto,

aumentando assim a sua massa molecular aparente e diminuindo a sua migração em relação à proteína não reduzida.

Esta fração foi posteriormente aplicada em uma coluna de fase reversa RP-HPLC usando uma coluna C2C18 (GE Healthcare Bio-Sciences) e revelou pico único, sugerindo elevado grau de pureza da amostra (Fig. 2B). Esta fração proteica (Q2) passou a ser denominada de *Botropoidina*. A massa molecular desta proteína ácida (pl de 3,76, Fig. 2D) quando determinada por MALDI TOF foi de 49.558Da (Fig. 2C). A diferença entre as massas moleculares determinadas por SDS-PAGE e espectrometria de massas pode ser explicada pela maior precisão dessa última técnica, refletindo melhor a massa molecular real da proteína.

Utilizando esta metodologia de purificação *Botropoidina* apresentou um rendimento de 0,34% da peçonha total (Tabela I). Estudo de transcriptoma da glândula da serpente de *Bothrops pauloensis* realizado por Rodrigues et al.,(2012), revelou que as metaloproteases são as mais abundantes das proteínas biologicamente ativas e apresentam uma grande variabilidade. Entretanto, apesar da grande variabilidade das metaloproteases, elas ocorrem nas peçonhas em baixa quantidade (Ramos e Selistre de Araujo, 2006).

A análise da sequência da metaloprotease *Botropoidina* foi inicialmente realizada por espectrometria de massa. Cerca de 80 $\mu$ g da proteína foi digerida com tripsina e o espectro dos fragmentos (Fig. 3A) foi analisado com o software *Biotools* (Bruker Daltonics) e a identificação da proteína foi realizada com o software *Matrix Science (Mascot Search Results)* (Fig. 3B). Para a identificação da proteína os peptídeos de massa 1094 e 2675 Da foram submetidos às análises de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) em espectrômetro de massa tipo duplo TOF com o método *LIFT* (Fig 3B). Esta análise revelou um *Score* altamente significativo (Scores > 49 e p<0.05) e elevada similaridade com outras metaloproteases de peçonha de serpentes incluindo o precursor da metaloprotease III presente na biblioteca de cDNA de *Bothrops neuwiedi* (gb|ADO21503.1) (Fig 3B).

O alinhamento das sequências peptídicas obtidas por MS/MS da protease *Botropoidina* com sequências de metaloproteases depositadas no banco de

dados (NCBI) (Fig 4), revelou um alto grau de identidade com resíduos de aminoácidos presentes nos domínios tipo desintegrina e rico em cisteína. Apesar da sequencia primária da *Botropoidina* não ter sido completamente elucidada, os dados apresentados no presente estudo sugerem que a toxina isolada é uma metaloprotease da classe PIII segundo a classificação mais recente proposta por Fox e Serrano (2008).

As enzimas proteolíticas ocorrem em grandes variedades nas peçonhas das serpentes da família Viperidae, e o substrato azocaseína apesar de não ser específico somente para metaloproteases de peçonhas ofídicas é muito utilizado para estudos de atividade enzimática e estabilidade de tais moléculas frente a variações de pH, temperatura, íons metálicos e inibidores de proteases (Gomes et al., 2011; Naves de Souza et al., 2012). A atividade azocaseinolítica foi utilizada para reconhecer as frações proteolíticas durante os passos cromatográficos de purificação, assim como para caracterizar a atividade enzimática da protease purificada. *Botropoidina* mostrou relevante ação proteolítica sobre a azocaseína (Fig 5) e quando incubada com inibidores de proteases tais como: EDTA e 1,10-fenantrolina teve a sua ação proteolítica completamente inibida (Fig 5), enquanto PMSF e aprotinina não alteraram a ação enzimática (Fig 5).

Sabe-se que as metaloproteases possuem Zn<sup>+2</sup> como um metal essencial para a sua atividade catalítica (Ramos e Selistre de Araujo, 2006). Então o tratamento com agentes quelantes inibe a sua atividade enzimática. A presença de atividade proteolítica após incubação da metaloprotease com os inibidores aprotinina e PMSF sugere a exclusão de serina do sítio ativo dessa toxina. Com base nestes resultados pode-se inferir que *Botropoidina* é uma enzima zinco dependente da classe das metaloproteases (SVMPs).

As sequências primárias de SVMPs revelam uma grande quantidade de resíduos de cisteína em seus diversos domínios, como pode ser evidenciado na figura 4. A presença destes resíduos pode levar à formação de ligações dissulfeto que estabilizam a estrutura tridimensional da proteína (Ramos e Selistre de Araujo, 2006; Muniz et al., 2008; Takeda et al., 2012). As pontes dissulfeto revelaram ser importantes para a estabilidade da estrutura tridimensional da metaloprotease *Botropoidina* e na sua atividade catalítica, uma vez que quando

incubada com  $\beta$ -mercaptoetanol a atividade proteolítica sobre a azocaseína foi significativamente inibida (Fig. 5).

O ensaio sobre o substrato azocaseína também foi realizado na presença de íons metálicos bivalentes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ) (Fig. 5). Este ensaio demonstrou que o íon  $\text{Ca}^{+2}$  aumentou levemente a atividade proteolítica da enzima, assim como os íons  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Ba}^{+2}$ . Foi demonstrado que metaloproteases geralmente apresentam sítios externos para ligação ao íon cálcio que estabilizam a estrutura tridimensional da enzima potencializando a sua ação proteolítica (Sun et al., 2006; Igarashi et al., 2007; Muniz et al., 2008).

O aumento da atividade por íons  $\text{Ca}^{+2}$  e a sua interação com metaloproteases já foram demonstrados por outros trabalhos, por exemplo, com a *Catrocollastatin*, uma SVMP da classe P-III proveniente da peçonha de *Crotalus atrox* que através de um estudo de cristalografia de raio X revelou três sítios de ligação para o íon  $\text{Ca}^{+2}$  em sua estrutura tridimensional (Igarashi et al., 2007).

A atividade azocaseinolítica da *Botropoidina* foi inibida na presença dos íons  $\text{Hg}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ . Uma possível explicação para este fato seria que, além do sítio ativo ligante de zinco envolvido na sua atividade proteolítica, estas toxinas possuiriam outros sítios ligantes de zinco, os quais poderiam ser ocupados por zinco ou outro íon contido na solução, resultando em uma mudança conformacional e perda da função proteolítica (Zhu et al., 1997). A interferência de íons metálicos na atividade proteolítica de metaloproteases de peçonhas de serpentes é bem descrita na literatura. Resultados semelhantes foram vistos para as metaloproteases, tais como: *BjussuMP-I* de *Bothrops jararacussu* (Mazzi et al., 2004), *Patagonfibrase* de *Philodryas patagoniensis* (Peichoto et al., 2007) e *Ammodytagin* de *Vipera ammodytes ammodytes* (Kurtovic et al., 2011).

O efeito da variação de pH e da temperatura sobre a atividade proteolítica de *Botropoidina* foi testado sobre o substrato azocaseína, sendo que *Botropoidina* apresentou pH ótimo na faixa de 6 - 9 e estabilidade térmica entre 30-40°C. No entanto observou-se uma significante diminuição da atividade proteolítica em pH ácido e temperatura maior que 50°C (Fig. 6). A susceptibilidade de metaloproteases a valores baixos de pH pode ser explicada pela polarização do resíduo de glutamato e a protonação dos resíduos de histidina, que por

consequência causa alteração no sitio catalítico da enzima zinco dependente (Ramos e Selistre de Araujo, 2006).

O desequilíbrio da hemostasia após o envenenamento ofídico pode ser induzido principalmente por enzimas proteolíticas que geralmente são classificadas de acordo com suas estruturas em serinoproteases e metaloproteases. A maioria das metaloproteases hemorrágicas e não hemorrágicas são fibrinogenolíticas, capazes de degradarem a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio e de forma mais lenta a cadeia  $\beta$  (Markland, 1998). Algumas fibrinogenases degradam rapidamente ambas as cadeias do fibrinogênio, e em geral não necessitam de outros fatores para serem ativadas, entretanto geralmente estas proteínas tem sua ação potencializada na presença de íons  $\text{Ca}^{+2}$  tendo em vista que elas geralmente apresentam uma região externa na sua estrutura tridimensional que acopla esse íon metálico bivalente, conferindo assim maior estabilidade à sua estrutura (Swenson & Markland, 2005, Igarashi et al., 2007, Peichoto et al., 2007).

A metaloprotease *Botropoidina* mostrou habilidade em degradar preferencialmente a cadeia  $\text{A}\alpha$  do fibrinogênio com  $5\mu\text{g}$  até 2 horas de incubação, sendo que a cadeia  $\text{B}\beta$  foi levemente degradada ao longo do tempo e a cadeia  $\gamma$  não sofreu ação proteolítica (Fig. 7A). Além de degradar o fibrinogênio, a protease foi capaz de degradar a fibrina de uma maneira tempo dependente (Fig. 7B). Neste ensaio a protease mostrou ser ativa principalmente sobre o dímero ( $\gamma - \gamma$ ) e sobre a cadeia  $\alpha$  nos tempos iniciais de incubação, entretanto com 12 horas de incubação observamos um efeito mais intenso sobre o dímero e a cadeia  $\alpha$  (Fig. 7B). De acordo com esses resultados, pode-se expandir a classificação dessa enzima para a classe das  $\alpha$ -fibrin(ogen)olíticas juntamente com *BjussuMP-I* proveniente da peçonha de *Bothrops jararacussu* (Mazzi et al., 2004), *Patagonfibrase* de *Philodryas patagoniensis* (Peichoto et al., 2007) e *Jararagina* de *Bothrops jararaca* (Moura-da-Silva & Baldo, 2012), entre outras.

Distúrbios na coagulação sanguínea proveniente do envenenamento por serpentes peçonhentas são geralmente atribuídos as enzimas fibrin(ogen)olíticas. Estas são capazes de agir sobre vários fatores da coagulação e sobre componentes da membrana basal, causando alterações no tempo de coagulação

sanguínea e contribuindo para o extravasamento sanguíneo (Swenson & Markland Jr., 2005, White, 2005, Escalante et al., 2011, Sajevic et al., 2011, Koh & Kini, 2012). *Botropoidina* foi incapaz de coagular o plasma bovino (*in vitro*) com doses de até 10 $\mu$ g, bem como não hidrolisou os substratos cromogênicos S-2238 (substrato para enzima *thrombin-like*), S-2222 (substrato para factor Xa), S-2302 (substrato para calicreina plasmática), S-2251 (substrato para plasmina) quando testada com doses de 1,0 e 2,0 $\mu$ g (resultados não apresentados). No entanto quando 5 $\mu$ g de *Botropoidina* foram injetados por via intraperitoneal em camundongos Balb-C, o sangue dos animais tornou-se incoagulável. Pôde-se observar também um aumento no tempo de protrombina (controle 25,5 s; *Botropoidina* >120 s; n=5) e no tempo de tromboplastina parcial ativada (Controle 29 s; *Botropoidina* 145 s; n=5). Estes resultados sugerem que *Botropoidina* interfere na coagulação sanguínea principalmente por diminuir o nível de fibrinogênio plasmático, tornando o sangue incoagulável.

A hemorragia é um dos principais efeitos observados no envenenamento por serpentes da família Viperidae. Esta ocorre principalmente por um complexo mecanismo de ações decorrentes das SVMPs, as quais podem induzir alterações na parede de microvasos e dessa forma causarem o extravasamento sanguíneo (Gutiérrez et al., 2005; Baldo et al., 2010; Escalante et al., 2011).

A atividade hemorrágica tanto da peçonha bruta da serpente de *Bothrops pauloensis* quanto da toxina *Botropoidina* purificada foi avaliada com diferentes doses utilizando camundongos da linhagem Balb-C (Fig 8 A). *Botropoidina* demonstrou ser uma potente toxina hemorrágica com DMH (dose mínima hemorrágica) de 0,98 $\mu$ g enquanto a DMH da peçonha de *Bothrops pauloensis* foi de 3,60 $\mu$ g (Fig. 8B). A hemorragia causada por *Botropoidina* foi completamente inibida quando a protease foi pré-incubada com solução 1mM e 10mM de EDTA (resultados não apresentados), o que pode sugerir a dependência do sítio catalítico da metaloprotease para atividade hemorrágica.

A atividade hemorrágica *in vivo* pode ocorrer por um mecanismo que depende da interação de eventos bioquímicos e biofísicos, a saber: Proteínas da membrana basal (MB) como fibronectina, colágeno tipo IV, laminina e proteínas da membrana de células endoteliais ou plaquetárias (integrinas) são degradados

pela ação dessas metaloproteases o que leva ao enfraquecimento da parede vascular. Em um segundo momento, forças hemodinâmicas, como pressão hidrostática, contribuem para a distensão e ruptura da parede dos capilares, provocando o extravazamento sanguíneo. Dessa forma a degradação de componentes da MB é fundamental para o início da hemorragia (Gutiérrez et al., 2005).

Estudos realizados por Baldo et al., (2010) indicam que a principal causa da hemorragia está realmente associada a danos causados nos microvasos e a capacidade de a enzima em permanecer ancorada às células. As SVMPs da classe P-III, são potentes hemorraginas pelo fato de possuírem em sua estrutura, além do domínio metaloprotease que apresenta a ação proteolítica, os domínios tipo desintegrina e rico em cisteína que proporcionam a capacidade aderente a componentes integrantes da membrana basal e assim potencializarem os danos causados na microvasculatura. Além disto, outro aspecto importante, que é apontado como ponteializador da ação hemorrágica das SVMPs da classe P-III, é a capacidade de resistir ao inibidor plasmático de proteases  $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-M) (Escalante et al., 2011).

*Botropoidina* foi capaz de degradar componentes da membrana basal tais como colágeno tipo IV e fibronectina (Fig. 9). As cadeias  $\alpha_1$ (220kDa) e  $\alpha_2$ (180kDa) do colágeno foram parcialmente degradadas quando 5 $\mu$ g da protease foram incubados com o colágeno tipo IV por 2 e 4 horas e praticamente todas as cadeias do colágeno sofreram degradação após 6 horas de incubação (Fig. 9A). Resultados semelhantes foram observados quando a mesma concentração da enzima foi incubada com fibronectina em diferentes intervalos de tempo. Entretanto a degradação das cadeias pesadas da fibronectina ocorreu após 6 horas de incubação (Fig. 9). A degradação do colágeno e fibronectina são eventos marcantes relacionados aos danos causados pelas SVMPs, levando em consideração que estas são as principais proteínas constituintes da membrana basal que estão relacionadas com a composição estrutural e adesão célula-célula (Escalante et al., 2011, Sajevic et al., 2011).

A inibição da agregação plaquetária é outro evento importante que contribui para a hemorragia induzida por SVMPs. Estas enzimas inibem a agregação

plaquetária por apresentarem capacidade de hidrolisar componentes da membrana de plaquetas e/ou interagir com integrinas plaquetárias. Diversas desintegrinas e/ou domínios semelhantes à desintegrinas presentes nestas peçonhas de serpentes tem a capacidade de ligar com integrinas existente em plaquetas, bloqueando a agregação e a formação do coágulo. Contribuindo, portanto para o quadro hemorrágico e intensificando os danos por consequência do envenenamento (Wijeyewickrema et al., 2005; Sajevic et al., 2011; Moura-da-Silva & Baldo, 2012).

A agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno foi显著mente inibida pela *Botropoidina* (Fig. 10A e 10B). Entretanto, essa enzima demonstrou maior inibição da agregação plaquetária induzida pelo colágeno (aproximadamente 80% quando comparado com o controle, Fig. 10B). Estes resultados sugerem que a enzima provavelmente possa interagir e ou clivar a integrina plaquetária  $\alpha_2\beta_1$  um receptor para o colágeno, dessa forma promovendo a inibição da agregação plaquetária. Resultados semelhantes foram descritos para a *Jararagina* (Tanjoni et al., 2010) e para outras SVMPs (Sajevic et al., 2011). No entanto, experimentos adicionais devem ser realizados para o melhor entendimento do papel dos domínios metalo e/ou tipo desintegrina na inibição da agregação plaquetária induzida por esta toxina.

O envenenamento botrópico é marcado por uma série de diferentes alterações fisiopatológicas, entre estas destacam-se a inflamação, mionecrose e alterações teciduais generalizadas. As lesões teciduais locais induzidas por essas peçonhas são uma consequência da ação enzimática principalmente de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e de SVMPs (hemorrágicas e não hemorrágicas), ou por uma ação sinérgica de ambas (Gutiérrez et al., 2009).

O dano tecidual local induzido pela toxina *Botropoidina* e pela peçonha de *Bothrops pauloensis* também foi investigado (Fig. 11). As análises por microscopia óptica dos cortes histológicos de músculos gastrocnêmio de animais tratados com a toxina revelaram um grande número de hemácias no espaço intersticial, caracterizando elevada ação hemorrágica. Também são observadas várias alterações morfológicas tais como necrose das fibras musculares, caracterizadas por citoplasma fracamente corado, um acentuado edema

evidenciado pelo espaçamento entre as células musculares e um aumento significativo do infiltrado inflamatório caracterizado principalmente por leucócitos polimorfonuclear. Estas alterações também foram observadas no tecido muscular de camundongos tratados com a peçonha de *B. pauloensis* (Fig. 11).

Com a finalidade de corroborar com a miotoxicidade induzida pela *Botropoidina*, a atividade creatina cinase (C.K.) no plasma sanguíneo de animais tratados com 5 $\mu$ g da toxina ou da peçonha total foi determinada após 3 horas de inoculação. A toxina e a peçonha total de *B. pauloensis* foram capazes de induzir um aumento de CK no plasma sanguíneo, atingindo níveis máximos de 455 U/L e 539U/L respectivamente, quando comparado com os valores obtidos para os animais controle (196 U/L) confirmando os resultados obtidos por microscopia óptica. (Fig.12). As lesões musculares podem ser causadas pela ação direta de miotoxinas, ou indiretamente, como consequência da isquemia resultante de distúrbios vasculares. O mecanismo de ação de metaloproteases hemorrágicas sobre o tecido muscular tem sido atribuído basicamente à ação dessas toxinas sobre capilares sanguíneos, levando à depleção de sangue que nutre as células musculares, induzindo isquemia e consequentemente morte celular (Gutiérrez et al., 1995, Hernández et al., 2011). Estudo realizado por Gutiérrez et al., (1995) demonstrou qua as alterações mionécroticas ocorrem rapidamente logo após a inoculação da metaloprotease hemorrágica *BaH1* de *Bothrops asper*. Neste estudo eles propõem que os danos no tecido muscular ocorrem como consequência da ação proteolítica da metaloprotease, o que acaretaria na perfusão reduzida do tecido.

De acordo com estes resultados, a metaloprotease hemorrágica *Botropoidina* contribui consideravelmente para os danos teciduais e sistêmicos relacionados ao envenenamento por serpentes da espécie *Bothrops pauloensis*.

As SVMPs também são capazes de interferir na adesão e viabilidade celular. A toxicidade dessas enzimas pode promover apoptose em cultura de células por diferentes mecanismos. Assim, alguns estudos indicam que o efeito destas toxinas deve-se à interação do domínio não catalítico com integrinas de membrana e outros estudos indicam que o domínio catalítico também participa do mecanismo que leva à apoptose celular. Ou seja, algumas proteases promovem a

apoptose através da proteólise dos componentes da matriz e clivagem das junções aderentes. Outras podem promover a apoptose tanto por ação proteolítica quanto pela ação do domínio não catalítico (D/C), o que acarretaria em um descolamento (perda de adesão da célula) um processo conhecido por anoikis (Diaz et al., 2005; Tanjoni et al., 2005; Brenes et al., 2010).

O efeito da *Botropoidina* na viabilidade e adesão celular foi avaliado utilizando diferentes concentrações da toxina em células endoteliais murinas (tEnd) por ensaio de MTT. A análise da viabilidade celular de culturas tEnd demonstrou a presença de células mortas 6 horas após o tratamento com a *Botropoidina* (Fig. 13A), seguida de aumento progressivo da morte celular com o passar do tempo de tratamento (Fig. 13B). A *Botropoidina* interferiu na viabilidade celular de maneira dose dependente, sendo que concentrações iguais ou superiores a 10 µg/mL induziram alterações significativas na viabilidade celular 24 horas após o tratamento (Fig. 13B). Quanto à interferência na adesão celular, observamos que concentrações acima de 10 µg/mL de *Botropoidina* foram capazes de induzir descolamento (perda de adesão) das células 6 horas após o tratamento (Fig. 13C). Este efeito foi mais acentuado ao longo de 24 horas, mostrando que houve um descolamento significativo das células da placa de cultura com as concentrações iguais ou superiores a 5µg/mL (Fig. 13D).

As células endoteliais são importantes alvos das SVMPs, e diversas metaloproteases podem induzir apoptose celular por mecanismos catalíticos, clivando as proteínas da matriz extracelular e integrinas envolvidas na adesão celular. De acordo com Masuda et al., (2001), a atividade proteolítica é essencial para apoptose induzida por *HV1*, uma SVMPs da classe P-III isolada da peçonha de *Trimeresurus flavoviridis*. A apoptose celular também pode ser atribuída aos mecanismos anti-adesivos das SVMPs. Os domínios tipo desintegrina e rico em cisteína da *Alternagrina*, uma SVMP isolada da peçonha de *Bothrops alternatus* interfere com as funções da integrina  $\alpha_2\beta_1$ , inibindo a adesão celular (Souza et al., 2000).

A toxina hemorrágica jararagina, inibiu a adesão de células endoteliais ao colágeno (Moura-da-Silva, 2001) e foi capaz de induzir apoptose em células endoteliais murina (tEnd) (Tanjoni et al., 2005). Nesse trabalho, foi demonstrado

que a *Jararagina* age de maneira seletiva a células endoteliais e interfere nas adesões. A apoptose por *anoikis* também foi o principal mecanismo envolvido na redução da viabilidade celular induzida pela *Jararagina* em HUVECs (Baldo et al., 2008). Dessa forma, a ação das SVMPs em células endoteliais envolve propriedades proteolíticas e anti-adesivas, que conjuntamente resultam na perda da interação célula-matriz, induzindo a morte celular.

A atividade catalítica da *Botropoidina* pode estar envolvida na inibição da adesão de células endoteliais. Este evento certamente está relacionado à atividade catalítica dessa toxina sobre os componentes da membrana basal, como discutido anteriormente. Entretanto, a inativação da atividade catalítica da *Botropoidina* não foi suficiente para abolir por completo este efeito. Como demonstrado, a *Botropoidina* tratada com EDTA ainda foi capaz de inibir a adesão das células endoteliais (Fig. 14). You et al. (2003), demonstraram que a atividade proteolítica da *Halysase*, proteína isolada da peçonha de *Gloydius halys* é parcialmente associada com a inibição da proliferação de células endoteliais, sendo que o domínio tipo desintegrina dessa toxina também pode estar envolvido na inibição da proliferação celular.

Assim, provavelmente além da ação proteolítica de *Botropoidina* sobre as células tEnd, há interferência de outros domínios da toxina que provavelmente interagem com integrinas impedindo e desfazendo a interação célula-célula.

A atividade hemorrágica das SVMPs é dependente da ação do domínio catalítico, contudo, alguns trabalhos demonstram que propriedades adesivas do domínio tipo desintegrina são fundamentais para a expressão dessa atividade, já que a ancoragem às proteínas da membrana basal é essencial para a manutenção da integridade das células endoteliais, e a inibição da adesão celular contribui para o enfraquecimento da estrutura da parede do vaso e a consequente hemorragia (Baldo et al., 2010, Moura-da-Silva & Baldo, 2012).

No presente trabalho foram apresentados pela primeira vez os resultados de isolamento e caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease hemorrágica (classe P-III) proveniente da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*. Esta enzima é capaz de degradar fibrinogênio, fibrina, fibronectina e colágeno, além de interferir na coagulação sanguínea por alterar o TTPa e TP.

*Botropoidina* também foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP e inibir a viabilidade e adesão de células endoteliais murina (tEnd). Dessa forma, conclui-se que a metaloprotease *Botropoidina* além de possuir toxicidade sobre células endoteliais, demonstra ser uma importante toxina responsável pelo quadro fisiopatológico envolvido no envenenamento por serpentes desta espécie.

#### **4. Referencias bibliográficas**

Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T.M., Moura-da-Silva, A.M., 2010. Mechanismy of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tessue distribution and in situ hydrolysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4, e727.

Baldo, C., Tanjoni, I., Leon, I.R., Batista, I.F., Della-Casa, M.S., Clissa, P.B., Weinlich, R., Lopes-Ferreira, M., Lebrun, I., Amarantes-Mendes, G.P., Rodrigues, V.M., Perales, J., Valente, R.H., Moura-da-Silva, A.M., 2008. *BnP1*, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon* 51, 54-65.

Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Costa, T.R., Gomes, M.S.R., Torres, F.S., Costa, J., Borges, M.H., Richardson, M., Santos, D.M., Pimenta, A.M.C., Homsi-Brandeburgo, M.I., Soares, A.M., Oliveira, F., 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 51, 574-584.

Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1995. Snake venom metalloproteinase: reprodysins. *Methods Enzymol.* 248, 345-368.

Bussolino, F., De Rossi, M., Sica, A., Colotta, F., Wang, J.M., Bocchietto, E., Padura, I.M., Bosia, A., Dejana, E., Mantovani, A., 1991. Murine endothelioma cell lines transformed by polyma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. *J. Immunol.* 147, 2122-2129.

Boukhalfa-Abib, H., Meksem, A., Laraba-Djebari, F., 2009. Purification and biochemical characterization of a novel hemorrhagic metalloproteinase from horned viper (*Cerastes cerastes*) venom. *Comp. Biochem. Physiol. C* 150, 285-290.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.

Brenes, O., Muñoz, E., Roldán-Rodríguez, R., Díaz, C., 2010. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. *Experimental and Molecular Pathology* 88, 424-432.

Ching, A.T.C., Rocha, M.M.T., Leme, A.F.P., Pimenta, D.C., Furtado, M.F.D., Serrano, S.M.T., Ho, P.L., 2006. Some aspects of the venom proteome of the Coludride snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. *FEBS Letters* 580, 4417-4422.

De Luca, M., Ward, C.M., Ohmori, K., Andrews, R.K., Berndt, M.C., 1995. *Jararhagin* and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrina collagen receptor,  $\alpha_2\beta_1$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206, 570-576.

Diaz, C., Valverde, L., Brenes, O., Rucavado, A., Gutierrez, J.M., 2005. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase *BaP1* on human endothelial cells. *J. Cell Biochem.*, 94, 520-528.

Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of Proteomics* 74, 1781-1794.

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

Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* 275, 3016-3030.

Gay, C.C., Maruñak, S.L., Teibler, P., Ruiz, R., Pérez, O.C.A., Leiva, L.C., 2009. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (*baltergin*) in mice. *Toxicon* 53, 53-59.

Gene, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L., 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activites of Costa Rican crotaline snake venom and their neutralization by polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841-848.

Gomes, M.S.R., Mendes, M.M., Oliveira, F., Andrade, R.M., Bernardes, C.P., Hamaguchi, A., Alcântara, T.M., Soares, A.M., Rodrigues, V.R., Homsi-Brandeburgo, M.I., 2009. *BthMP*: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 53, 24-32.

Gomes, M.S.R., Queiroz, M.R.Q., Mamede, C.C.N., Mendes, M.M., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M.I., Sousa, M.V., Aquino, E.N., Castro, M.S., Oliveira, F., Rodrigues, V.M. 2011. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (*BleucMP*) from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 153, 290-300.

Grams, F., Huber, R., Kress, L.F., Moroder, L., Bode, W., 1993. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett.* 335, 76-80.

Gutiérrez, J.M., Romero, M., Nuñes, J., Chaves, F., Borkow, G., Ovadia, M., 1995. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of *BaH1*, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Exp. and Mol. Path.* 62, 28-41.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011.

Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., 2009. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54, 976-987.

Hernández, R., Cabalceta, C., Saravia-Otten, P., Chaves, A., Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2011. Poor regenerative outcome after skeletal muscle necrosis induced by *Bothrops asper* venom: alterations in microvasculature and nerves. *PLoS One* 6, e19834.

Hamza, L., Gargioli, C., Castelli, S., Rufini, S., Laraba-Djebari, F., 2010. Purification and characterization of a fibrinogenolytic and hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Vipera lebetina* venom. *Biochimie* 92, 797-805.

Han, Y.P., Lu, X.Y., Wang, X.F., Xu, J., 2007. Isolation and characterization of a novel P-II class snake venom metalloproteinase from *Trimeresurus stejnegeri*. *Toxicon* 49, 889-898.

Igarashi, T., Satohiko Araki, S., Hidezo Mori, H., Takeda, S., 2007. Crystal structures of *catrocollastatin/VAP2B* reveal a dynamic modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. *FEBS Letters* 581, 2416–2422.

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* 36, W5–W9.

Kamiguti, A.S., Gallager, P., Marcinkiewicz, C., Theakston, R.G.D., Zuzel, M., Fox, J.W., 2003. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinase responsible for the inhibition of platelet function. *FEBS Letters* 549, 129-134.

Koh, C.Y., Kini, R.M., 2012. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. *Toxicon* 59, 497-506.

Kumar, R.V., Raghavendra Gowda, C.D., Shivaprasad, H.V., Siddesha, J.M., Sharath, B.K., Vishwanath, B.S. 2010. Purification and characterization of “*Trimarin*” a hemorrhagic metalloprotease with factor Xa-like Activity, from *Trimeresurus malabaricus* Snake venom. *Thrombosis Research* 126, 356-364.

Kurtovic, T., Brgles, M., Loenardi, A., Balija, M.L., Krizaj, I., Allmaier, G., Marchetti-Deschmann, M., Halassy, B., 2011. *Ammodytagin*, a heterodimeric metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom with strong hemorrhagic activity. *Toxicon* 58, 570-582.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.

Lopes, D.S., Baldo, C., Oliveira, C. F., Alcântara, T.M., Oliveira, J.D., Gourlart, L.R., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M.I., Moura-da-Silva, A.M., Clissa, P.B., Rodrigues V. M., 2009. Characterization of inflammatory reaction induced by *neuwiedase*, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. *Toxicon* 54, 42-9.

Markland, F. S., 1998. Snake venoms and the haemostatic system. *Toxicon*, v.36, p. 1749-1800.

Masuda, S., Hayashi, H., Atoda, H., Morita, T., Araki, S., 2001. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, *HV1*, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur. J. Biochem.* 268, 3339-3345.

Mazzi, M.V., Marcussi, S., Carlos, G.B., Ticli, F.K., Stábeli, R.G., Franco, F.K., Cintra, A.C., Franca, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S.V., 2004. A new hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararacussu* snake venom: Isolation and biochemical characterization. *Toxicon* 44, 215-223.

Moura-da-Silva, A.M., Marcinkiewicz, C., Marcinkiewicz, M., Niewiarowski, S., 2001. Selective recognition of  $\alpha_2\beta_1$  integrin by *Jararhagin*, a metalloproteinase/disintegrin-like from *Bothrops jararaca* venom. *Thromb. Res.*, 102, 153-159.

Moura-da-Silva, A.M., Ramos, O.H.P., Baldo, C., Niland, S., Hansen, U., Ventura, J.S., Furlan, S., Butera, D., Della-Casa, M.S., Tanjoni, I., Clissa, P.B., Fernandes, I., Chudzinski-Tavassi, A.M., Eble, J.A., 2008. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinase. *Biochimie* 90, 484-492.

Moura-da-Silva, A.M. & Baldo, C., 2012. *Jararhagin*, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 60, 280-289.

Moraes, C.K., Selistre-de-Araujo, H.S., 2006. Effect of rACLF, a recombinant snake venom metallopeptidase on cell viability, chemokine expression and degradation of extracellular matrix proteins. *Toxicon* 48, 641-648.

Muniz, J.R.C., Ambrosio, A.L.B., Selistre-de-Araujo, H.S., Cominetti, M.R., Moura-da-Silva, A.M., Olivia, G., Garratt, R.C., Souza, D.H.F., 2008. The three-dimensional structure of *bothropasin*, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: Insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups *Toxicon* 52, 807-816.

Naves de Souza, D.L., Gomes, M.S.R., Ferreira, F.B., Rodrigues, R.S., Achê, D.C., Richardson, M., Borges, M.H., Rodrigues, V.M., 2012. Biochemical and Enzymatic characterization of *BpMP-I*, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 161, 102-109.

Neiva, M., Arraes, F.B.M., Souza, J.V., Rádis-Baptista, G., Prieto, A.R.B.S., Walter, M. E.M.T., Brigido, M.M., Yamane, T., López-Lozano, J.L., Astolfi-Filho, S., 2009. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon* v. 53, 427-436.

Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Sugihara, H., Tu, A.T., 1984. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*(Western Diamondback Rattlesnake). *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 309-319.

Paine, M.J., Desmond, H.P., Theakston, R.D., Crampton, J.M., 1992. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, *jararhagin*, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *Journal of Biological Chemistry* 267, 22869-22876.

Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.

Peichoto, M.E., Teibler, P., Mackessy, S.P., Leiva, L., Acosta, O., Gonçalves, L.R.C., Tanaka-Azevedo, A.M., Santoro, M.L., 2007. Purification and characterization of *patagonfibrase*, a metalloproteinase showing  $\alpha$ -fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 810-819.

Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araujo, H.S., 2006. Review: Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 142, 328-346.

Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Guerra-Sá, R., Rodrigues, V., Fontes, M.R.M., Giglio, J.R., 2000. Structural and functional characterization of *neuwiedase*, a nonhemorrhagic fibri(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 381, 213-224.

Rodrigues, R.S., Boldrini-França, J., Fonseca, F.P.P., Torre, P.L., Henrique-Silva, F., Sanz, L., Calvete, J.J., Rodrigues, V.M., 2012. Combined snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. *Journal of Proteomics* 75, 2707-2720.

Sajevic, T., Leonardi, A., Krizaj, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57, 627-645.

Siigur, E., Tonismagi, K., Trummal., Samel, M., Vija, H., Subbi, J., Siigur, J., 2001. Factor X activator from *vipera lebetina* snake venom, molecular characterization and substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1568, 90-98.

Silva, M.B., Schattner, M., Ramos, C.R., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Guarnieri, M.C., Lazzari, M.A., Sampaio, C.A., Pozner, R.G., Ventura, J.S., Ho, P.L., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2003. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-cesa) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem. J.* 369, 129-139.

Silva, V.X., Rodrigues, M.F., 2008. Taxonomic revision of the Bothrops neuwiedi complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. *Phylomedusa* 7, 45–90.

Souza, D.H., Iemma, M.R., Ferreira, L.L., Faria, J.P., Oliva, M.L., Zingali, R.B., Niewiarowski, S., Selistre-de-Araujo, H.S., 2000. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease *alternagin* inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.*, 384, 341-450.

Sun, M.Z., Liu, S., Greenaway, F.T., 2006. Characterization of a fibrinolytic enzyme (*ussurenase*) from *Agristodon blomhoffii ussurensis* snake venom: Insights into the effects of Ca<sup>+2</sup> on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 1340-1348.

Swenson, S., Markland Jr, F.S., 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* 45, 1021-1039.

Tanjoni, I., Weinlich, R., Della-Casa, M.S., Calissa, P.B., Saldanha-Gama, R.F., De Freitas, M.S., Barja-Fidalgo, C., Amarante-Mendes, G.P., Moura-da-silva, A.M., 2005. *Jararhagin*, a snake venom metalloproteinase induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. *Apoptosis* 10, 851-861.

Tanjoni, I., Evangelista, K., Dell-Casa, M.S., Butera, D., Magalhães, G.S., Baldo, C., Clissa, P.B., Fernandes, I., Eble, J., Moura-da-Silva, A.M., 2010. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase *jararhgin* are involved in binding to  $\alpha_2\beta_1$  integrin and collagen. *Toxicon* 55, 1093-1099.

Takeda, S., Takeya, H., Iwanaga, S., 2012. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics* 1824, 164-176.

Tashima, A.K., Sanz, L., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T., Calvete, J.J., 2008. Snake venomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. *Journal of Proteomics* 71, 473-485.

Valle, A. L., Brites, V.L.C., 2008. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. *Rev Bras Zoociências* 10, 155–161.

Wijeyewickrema, L.C., Berndt, M.C., Andrews, R.K., 2005. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon* 45, 1051-1061.

White, J., 2005. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* 45, 951-967.

You, W.K., Seo, H.J., Chung, K.H., Kim, D.S., 2003. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrinlike domains. *J. Biochem.* 134, 739–749.

You, W.K., Jang, Y., Chung, K., Jeon, O., Kim, D., 2006. Functional roles of the two distinct domains of *halysase*, a snake venom metalloproteinase, to inhibit human platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Commun.*, 339, 964-970.

Zenalis, A. Andrade-Silva, D., Rocha, M.M., Serrana, S.M., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Ho, P.L., 2012. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6, e1554.

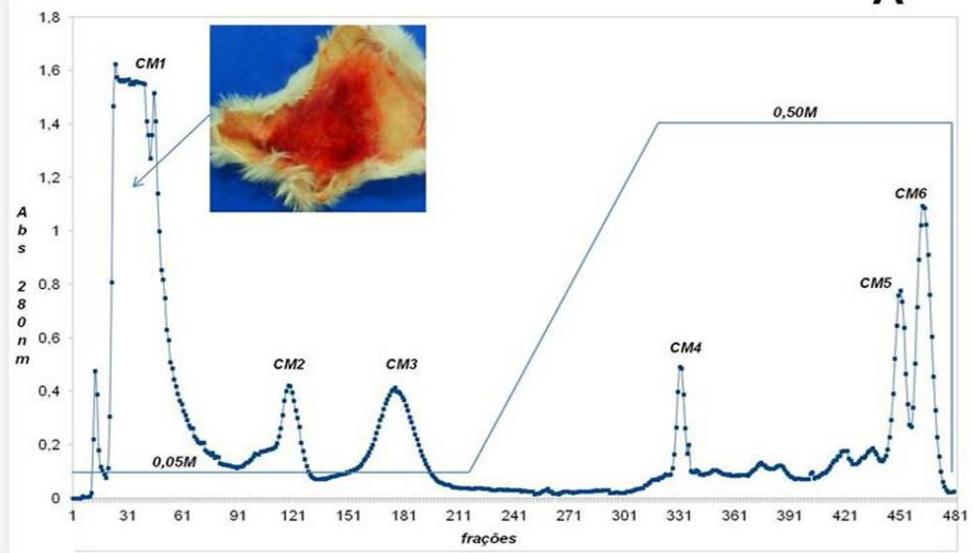
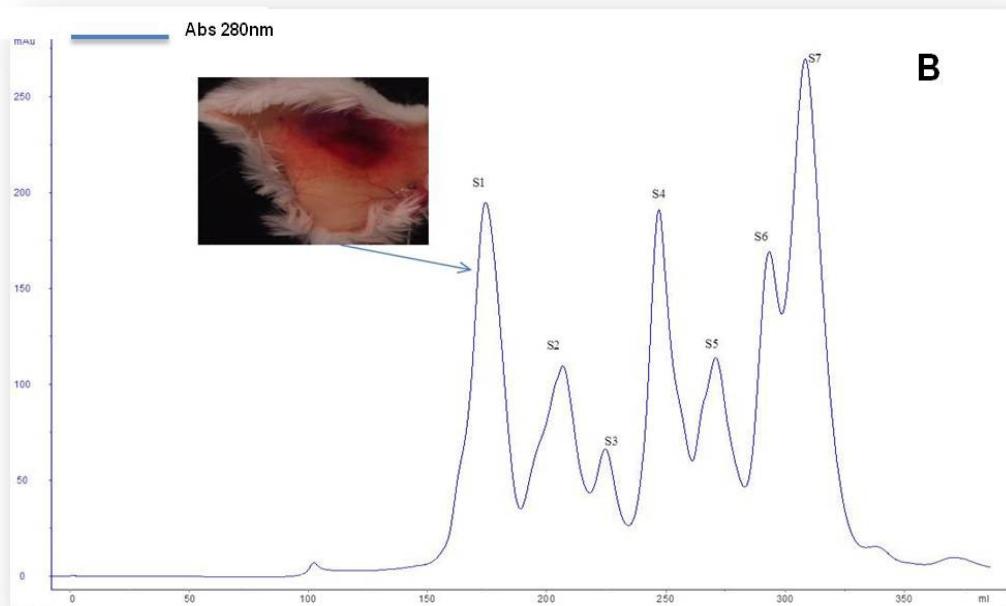
Zhu, Z., Gong, W., Zhu, X., Teng, M., Niu, L., 1997. Purification, characterization and conformational analysis of a haemorrhagin from the venom of *Agrkistrodon acutus*. *Toxicon* 35, 283-292.

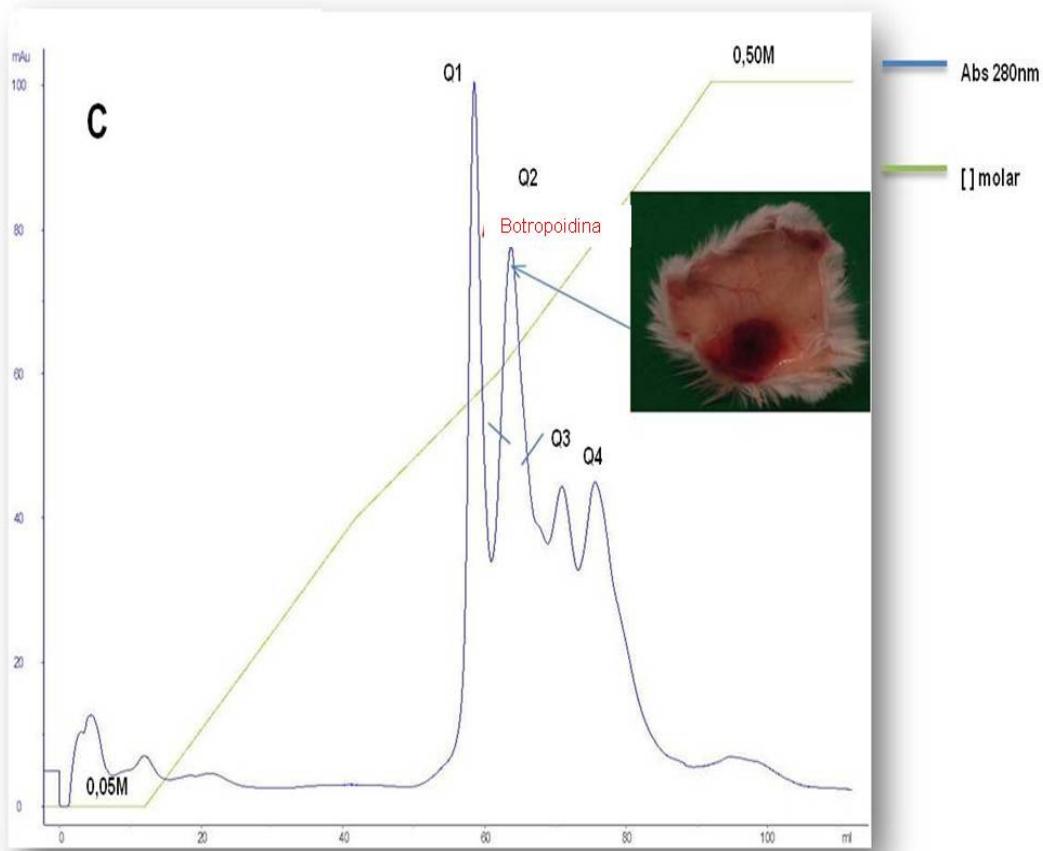
Zigrino, P., Kamiguti, A.S., Eble, J., Drescher, C., Nischt, R., Fox, J.W., Mauch, C., 2002. The reprolysin *jararhagin*, a snake venom metalloproteinase, functions as fibrillar collagen agonist involved in fibroblast adhesion and signaling. *J. Biol. Chem.*, 277, 40528-40535.

---

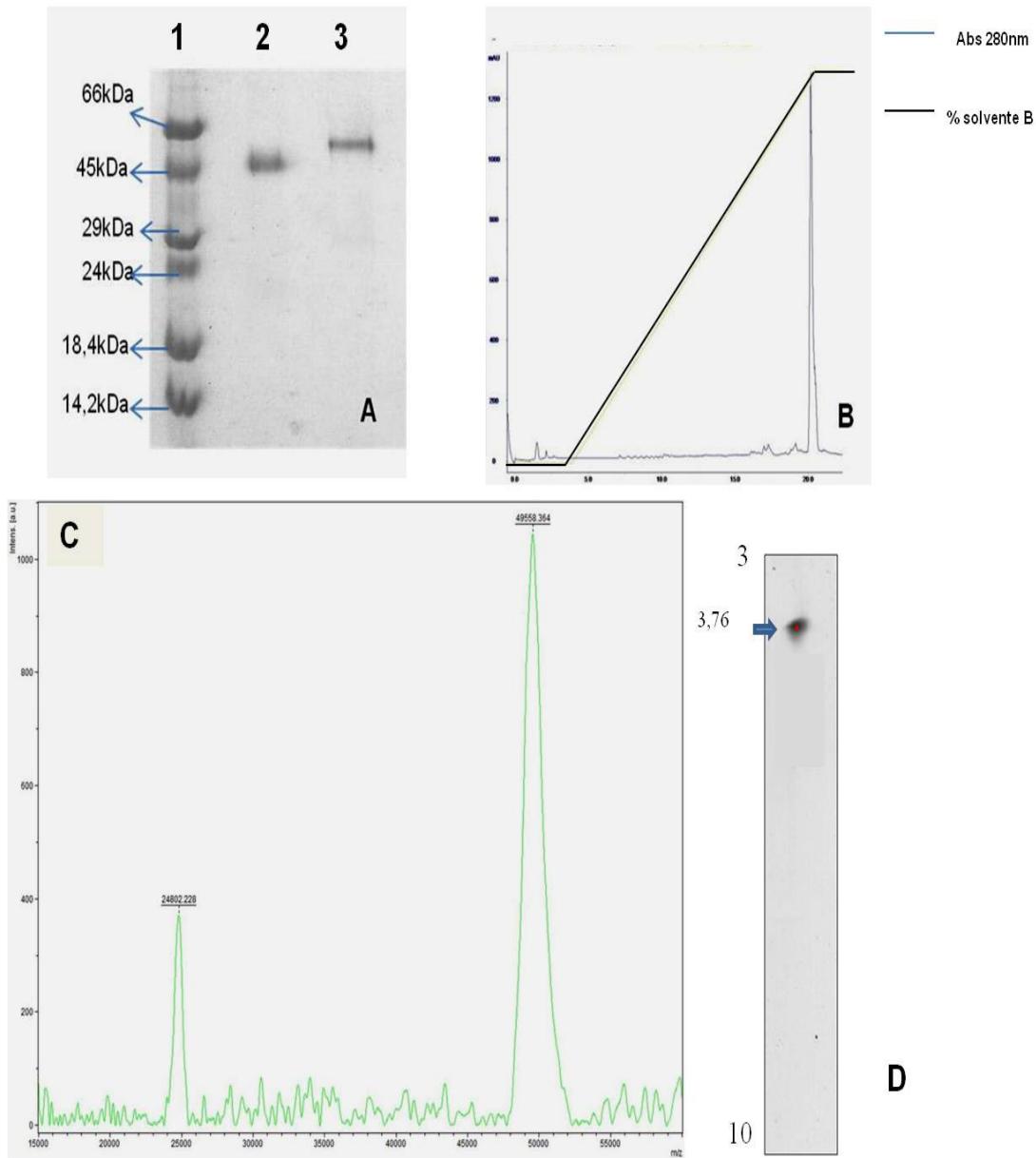
*Figuras e Legendas*

---

**A****B**



**Figura 1:** (A) Cromatografia de troca-iônica da peçonha de *Bothrops pauloensis* (125 mg) em uma coluna de 1,4 x 26cm contendo CM-Sepharose a qual foi previamente equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 50mM pH 7,8 e eluída em um gradiente contínuo de 0,05M a 0,5M do mesmo tampão a 25°C. Frações de 1ml/tubo foram coletadas a um fluxo de 6,6 mL/h e as absorbâncias foram monitoradas a 280 nm. (B) Cromatografia da fração CM1 (34mg) em coluna de gel filtração HiPrep Sephadryl S-300 (26/60) previamente equilibrada e eluida com 50mM de tampão AMBIC, pH 7,8, usando um equipamento AKTA prime plus (GE Healthcare Bio-Sciences). As frações foram coletadas a 2,0 mL/tubo e as absorbâncias determinadas a 280nm. (C) Cromatografia da fração S1 (8,75 mg) em resina HiTrep Capto Q (três colunas acopladas de 1 mL cada) previamente equilibrada com tampão (AMBIC) 50mM pH 7.8 e eluida com o mesmo tampão em um gradiente de (50-500mM), a fração Q2 exibiu atividade hemorrágica.



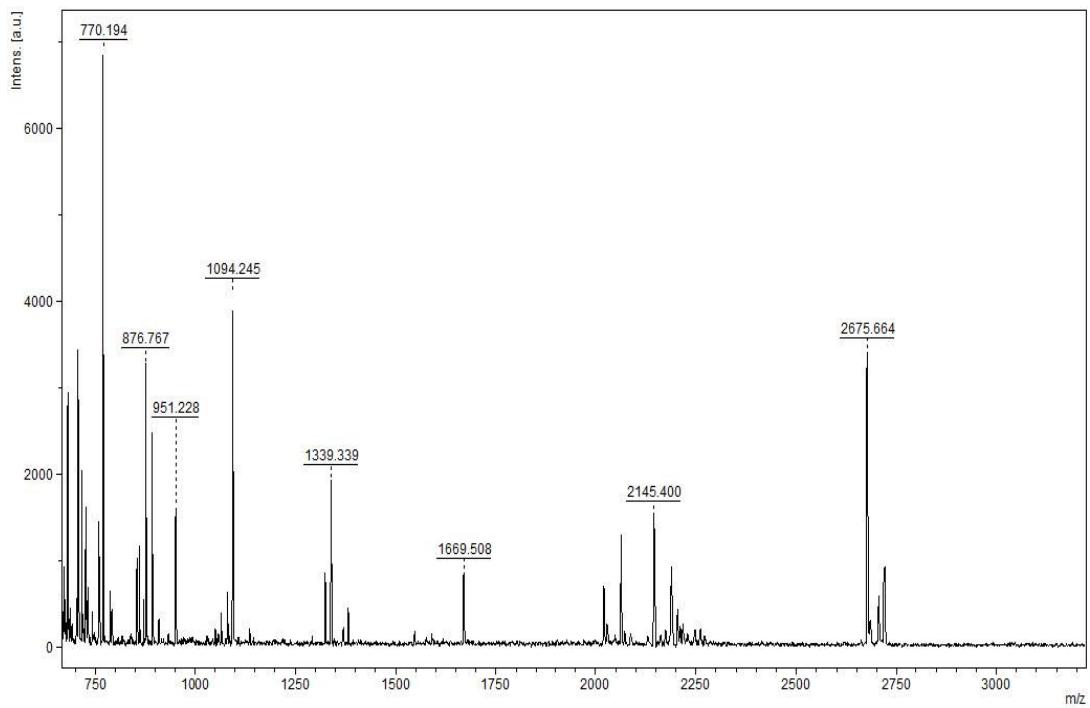
**Figura 2:** (A) SDS-PAGE (13,5%). (1) Marcador de massa molecular. (2) 5 $\mu$ g da protease *Botropoidina* (não reduzida). (3) 5 $\mu$ g de *Botropoidina* (reduzida). (B) Perfil da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa da fração Q2. Coluna  $\mu$ RPC C2C18 de 4.6x150mm (GE Healthcare Bio-Sciences). Amostras de 200  $\mu$ g foram dissolvidas em 200  $\mu$ l do solvente A\*, centrifugados a 10.000xg por 5 minuto. A proteína foi eluída com um gradiente linear de 0 a 100% do solvente B\*\*. O pico foi eluído a um fluxo de 0,5ml/min. A absorbância foi monitorada a 280 nm. (C) Massa molecular de *Botropoidina* determinada por espectrometria de massa MALDI TOF-MS (49.558 Da). (D) Focalização isoelétrica da *Botropoidina* determinada por sistema de eletroforese bidimensional (pH de 3-10). \*Solvente A: acetonitrila 5% em TFA 0,1% (v/v) \*\* Solvente B: acetonitrila 80% em TFA 0,1 % (v/v).

**Tabela 1:** Rendimento protéico e recuperação da atividade azocaseinolítica durante as etapas de purificação da protease *Botropoidina* proveniente da peçonha de *B. pauloensis*.

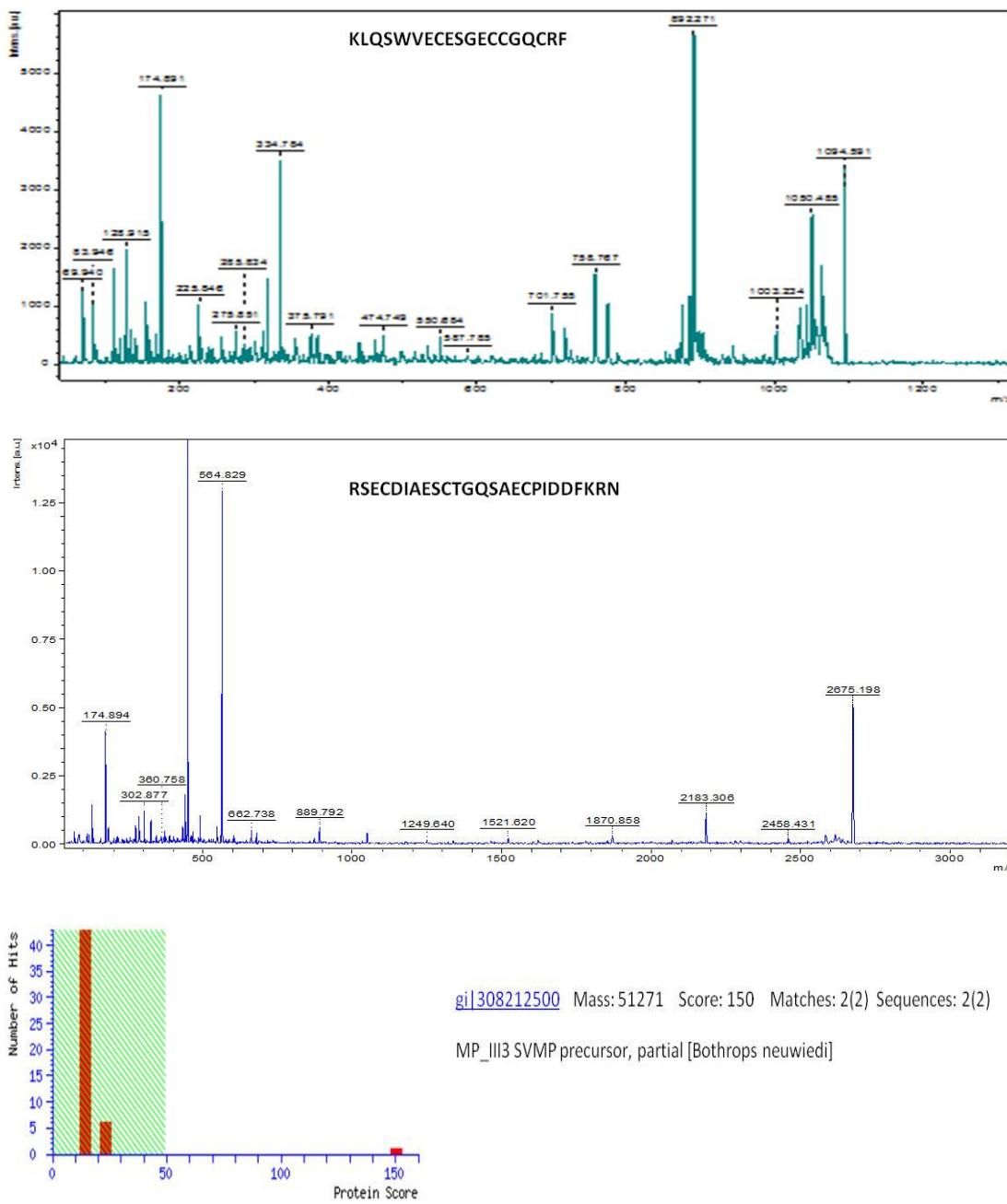
	<i>Proteína total (mg) *</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Atividade azocaseinolítica (U/mg) **</i>
<i>Peçonha bruta</i>	<b>125</b>	<b>100</b>	<b>8.40</b>
<i>CM1</i>	<b>34</b>	<b>27.2</b>	<b>6.50</b>
<i>SI</i>	<b>8.75</b>	<b>7.0</b>	<b>5.55</b>
<i>Botropoidina</i>	<b>0.423</b>	<b>0.34</b>	<b>6.46</b>

\*Concentração protéica determinada pelo método Bradford (1976).

\*\*A atividade foi expressa em U/mg pelo media  $\pm$ SD (n=3) (1 U representa o aumento de 0,01 Abs a 405 nm).



**Figura 3A:** Espectro do perfil de massas dos fragmentos obtidos a partir da digestão da Botropoidina com a tripsina. Os espectros de massa foram analisados com o software *Biotools* (Bruker Daltonics) e os valores são mostrados em Da.



**Figura 3B:** Espectros dos peptídeos obtidos por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF). Alguns espectros dos parentais obtidos por MS/MS com o método *LIFT* utilizados na identificação da proteína com o software Mascot. O histograma demonstra o *Score* altamente significativo (*Scores* > 49 e *p*<0.05), após a análise dos fragmentos, indicando uma alta similaridade com a MP\_III3 SVMP de *Bothrops neuwiedi*, acesso g|308212500 / Massa: 51.271 Da.

```
gi|82219706|sp|Q98UF9.3|VM3H3_BOTJA
gi|387014248|gb|AFJ49423.1|
gi|520001475|sp|P20164.4|VM3HB_PROF1
gi|52000724|sp|Q8JIR2.1|VM3HA_PROF1
gi|338855324|gb|AEJ31991.1|
gi|308212496|gb|ADO21501.1|
gi|308212498|gb|ADO21502.1|
gi|308212500|gb|ADO21503.1|
GR955266.1
GR955267.1
```

KMCGVQTQNWESEPIKKASQLVVAEQQRY-NHYKYIELVILADYRMTKNGNGLDKIRTKIYEIVNLNEIFRY  
KMCGTETNWESDEPIKKASQLNIEPEQQRYLNPFYRVELVIVADHGMVTKNNGNDLKIRTSIYEVTNLNEIFRY  
KMCGVQTQNWESEPIKKASKLVLVTAEEQQRF--PRTYKLIAVLUHDGIVTKVHKGNNLKKRKYIWOLVNTNIINRY  
KMCGVQTQNWESEPIKKASKLVLVTAEEQQRFLFELVIVADYRMTFKFNSNLNEVKTWYVEIVNTLNEIYR  
KMCGTETNWESDEPIKKASHLNLIEPEQQRYLNPFYRVELVIVADHGMVTKNNGNDLKIRTSIYEVTNLNEIFRY  
KMCGVQTQNWESEPIKKDSNLPHFHQHRY-NRYKVELLIVADYKMTVRNGNLDEIRTKIYEIVNNVNVI  
KMCGVQTQNWESEPIKKASQLNFHFPHQHRY--NHYNYVELIIVADYKMTVRNGNLDEIRTKIYEIVNNVNVI  
KMCGVQTWNKSDEPIKKASQLVVAEQQRY-NPYKYEVVVIIVADYRMTKNGNGLDEIRTKIYEIVNLNEIFRY

```
gi|82219706|sp|Q98UF9.3|VM3H3_BOTJA  
gi|387014248|gb|AFJ49243.1|  
gi|520001475|sp|P20164.4|VM3HB_PROF1  
gi|520007241|sp|Q8JJR2.1|VM3HA_PROF1  
gi|338855324|gb|AEJ31991.1|  
gi|308212496|gb|ADO21501.1|  
gi|308212498|gb|ADO21502.1|  
gi|308212500|gb|ADO21503.1|  
GR955266.1  
GR955267.1
```

LYIRIALVGEIWSNADLSNTLSDDTLASFGTWRGTVLLRKSHDNDQLLTAIDFDGQTIGIANIASMCNQNKS  
LSIRIALVGEIWSKRDLTMTSAAKVTLDLSFGNWRVTLDRKSHDNDQLLTAIEFDGVTGIAQIASMCDLKR  
LNILVALVLEYISQNKITVQSASNVTLDFGDWRSEVLLRKSHDNDQLLTAIDFDGPTIGKAYTASMCDPKR  
LYVRVALVALEWVNSKGNDLSSVTLISAYDTLDSFGEWRKRDLLRKSHDNDQLLTAIDFNGTIIGLAHVASMCDPKCS  
LSIRIALVGEIWSKRDLTMTSAAKVTLDLSFGNWRVTLDRKSHDNDQLLTAIEFDGVTGIAQIASMCDLKR  
LYIRIALVATEIWNSGNDLINVESAANVTLDSFGTWREKDLLRKSHDNDQLLTAIDFNGPTIGTAVASMCDPKR  
LYIRIALVATEIWNSGNDLINVESAANVTLDSFGTWREKDLLRKSHDNDQLLTAIDFNGLTIGTAVASMCDPKR  
LYIRIALVGEIWSNRDLINVTSASGDTLDSFGTWRGTDLLRKSHDNDQLLTAIDLGDGPTIGIAKAGMCKLNES

```
gi|82219706|sp|Q98UF9.3|VM3H3_BOTJA
gi|387014248|gb|AFJ94243.1|
gi|52001475|sp|P20164.4|VM3HB_PROF1
gi|52000724|sp|Q8JIR2.1|VM3HA_PROF1
gi|338855324|gb|AEJ31991.1|
gi|308212496|gb|ADO21501.1|
gi|308212498|gb|ADO21502.1|
gi|308212500|gb|ADO21503.1|
GR955266.1
GR955267.1
```

VGVVMDYDPSI NLVVA VIMAHEMGHNL GINHD TGCS CGGYSC IMAP EISDQPSKLF NSCSK QAYQR YINV YKPQ CI  
VGIVDR LSETNLL VAVTA MHEL GHNL GMTHD ENCY CT CGGYSC IMASV ALSD QTSL FNSCSKE YYR KY IN YDPC P  
VGIVD QSYPI NLVVA VIMTHEMGHNL GIPHD NGSC TCGG FP CIMS PMSI DPPS NL FNSCSK RAYQTFL DHDK PC  
TGIV QDYSSRN L VAVVIMAHEMGHNL GIRHDRENC TCHAN SC IMASV ISDQPSK YFNSC SHVQ WNY IN DDEP C  
VGIVDR LSETNLL VAVTA MHEL GHNL GMTHD ENCY CT CGGYSC IMASV ALSD QTSL FNSCSKE YYR KY IN YDPC P  
VGIVMDYLSLN SFVLAVIMAHEMGHNL GMHDHTD TGCS CGGYSC IMSSGMSH QPKL FNSCSKE YYR KY WLF IMQ KQPC  
VGVVQDYSSLSNFV LAVIMAHEMGHNL GMHDHTD TGCS CGGYSC IMSPGMSH QPKL FNSCSKE YYR KY WLF IMQ KQPC  
VGVVQDYSPISFV VAVVIMAHEMGHNL GIIHD TGFC CSC CGGHSC IMSP EISDPPSNL FNSCSK QAYQR YINV YKPQ CI  
-----  
VGVVQDYSPISFV VAVVIMAHEMGHNL GIIHD TGFC CSC CGGHSC IMSP EISDPPSNL FNSCSK QAYQR YINV YKPQ CI

```
gi|82219706|sp|Q98UF9.3|VM3H3_BOTJA
gi|387014248|gb|AFJ49243.1|
gi|52001475|sp|P20164.4|VM3HB_PROFL
gi|52000724|sp|Q8JR2.1|VM3HA_PROFL
gi|338855324|gb|AEJ31991.1|
gi|308212496|gb|AD021501.1|
gi|308212498|gb|AD021502.1|
gi|308212500|gb|AD021503.1|
GR955266.1
GR955267.1
Botropoidina
```

\* LNEPLRTDIVSPPVCGNELLMEGECDCGSPRNCRDPCCDAATCKLHSWVECESGECCDQCQCRFKGAGTECRAARSE  
 LNEPLRTDIVSPPICGNELLVEGECDCGSPRNCRDPCCDAASCLLHSWVECESGECCQOCQCRFMKEGTVCRRARSE  
 LNAPSSTDIVSPPVCGNELLMEAGECDCGSPNENCOYQCCDAHLLHSWVKCSEGCCDQCQCRFTAGTECRAAESE  
 LNEPLRTDIVSPPVCGNELLVEGECDCGSPATCRYPCPCCDAATCKLHSWVECESGECCCECQCRFTAGTECRAARSE  
 LNEPLRTDIVSPPICGNELLVEGECDCGSPRNCRDPCCDAASCLLHSWVECESGECCQOCQCRFMKEGTVCRRARSE  
 LNEPLRTDIVSPPVCGNELLMEGECDCGSPRNCRNPCCDAATCKLHPWVECESGECCGQCQCRFIKTNGVNCRPQSE  
 LNEPLRTDIVSPPVCGNELLMEGECDCGSPRNCRNPCCDAATCKLHPWVECESGECCGQCQCRFIKAGNNVCRPQSE  
 LNEPLRTDIVSPPVCGNELLMEGECDCGSPTNCRYPCPCCDAATCKLQSWVECESGECCGQCQCRFKGPASEQAARSE  
 LNEPLTDDIVSPPVCGNELLVEGECDCGSPTNCRYPCPCCDAATCKLQSWVECESGECCGQ-----  
 -----KLSWVECESGECCGQCQCRF-----PSE

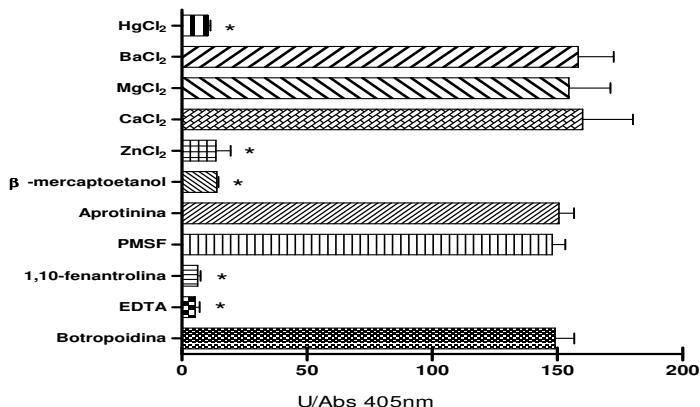
```
gi|82219706|sp|Q98UF9.3|VM3H3_BOTJA
gi|387014248|gb|AFJ49243.1|
gi|52001475|sp|P20164.4|VM3HB_PROFIL
gi|52000724|sp|Q8JIR2.1|VM3HA_PROFIL
gi|338855324|gb|AEJ31991.1|
gi|308212496|gb|ADO21501.1|
gi|308212498|gb|ADO21502.1|
gi|308212500|gb|ADO21503.1|
GR955266.1
GR955267.1
Botropoidina
```

CDIAE5CTGQSAADCP TDDFKRNGQPCLHNYGYCYNGNCPIMYHQCYALFGSATVAEDGC FEFNEGDKYF YCRKE  
CDIPESCTGQSAECP MDDFH RNRNGQPCLNNHG CYNGTCPILYHQCYALFGSSATVAEDDC FNINDSGDKYF YCRKE  
CDIPESCTGQSAADCP TDFRH RNRNGQPCLNNHG CYNGTCPIMYHQCYFLFGSATVAEDDC FNINDSGDKYF YCRKE  
CDIAE5CTGHSAADCP TDFRH RNRNGQPCLNNHG CYNGTCPILYHQCYALFGWANATVAKDSFCFDNQGNDY GCRKE  
CDIPESCTGQSAECP MDDFH RNRNGQPCLNNHG CYNGTCPILYHQCYALFGSATVAEDDC FNINDSGDKYF YCRKE  
CDIAE5CTGQSAOCP TDFHKRNGQPCLSNYGYCYNGNCPIMH HQCYALFGSATVAQDGF KFNDRGDKF YCRKE  
CDIAE5CTGQSAQCPTDFHKRNGQPCLSNYGYCYNGNCPIMH HQCYALFGSAIVAQDGF KFNDRGDKF YCRKE  
CDIAE5CTGQSAECPIDDFKRNGQPCLHNYGYCYNGNCPIMYHQCYTLFGADTV AEDGCF NANEKGDEYFY CRKE  
CDIAE5CTGQSAECPIDDFKRNGQPCLHNYGYCYNGNCPIMYHQCYTLFGADTV AEDGCF NANEKGDEYFY CRKE  
CDIAE5CTGQSAECPIDDFKRN-----

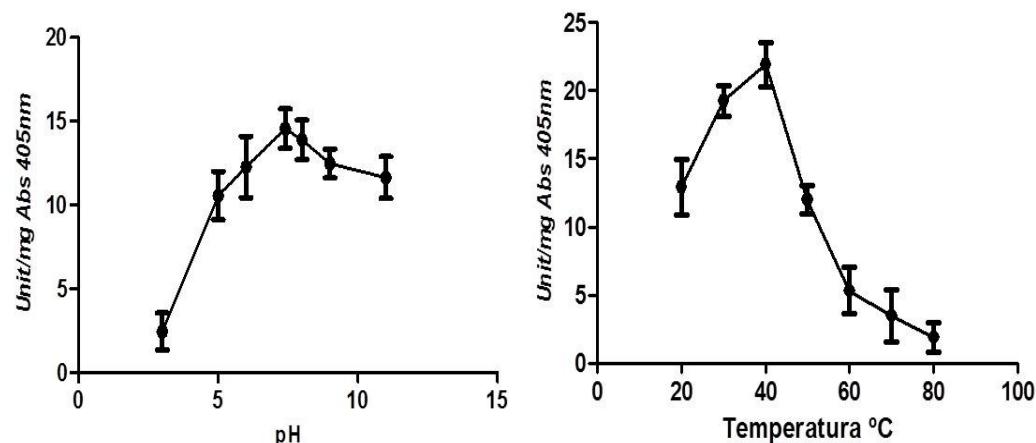
```
gi|82219706|sp|Q98UF9.3|VM3H3_BOTJA
gi|387014248|gb|AFJ49243.1|
gi|52001475|sp|P20164.4|VM3HB_PROFIL
gi|52000724|sp|Q8JTR2.1|VM3HA_PROFIL
gi|338855324|gb|AEJ31991.1|
gi|308212496|gb|ADO21501.1|
gi|308212498|gb|ADO21502.1|
gi|308212500|gb|ADO21503.1|
GR955266.1
GR955267.1
```

SGVNIPCAQEDVKCGRLFCHT-KKHPDCYKYS-EDDPDYGMDNGTKCADGKVCS-NGHCVDVATAY-----  
NEKYIPCAQDVKCGRLFCDN-KKYPCHYDYS-EDDPDYGMDHGTCKADGKVCSNRQCVDVITAY-----  
NEKYIPCAQEDVKCGRLFCDN-KKYPCHYNS-EDDPDYGMDHGTCKADGKVCS-NRQCVDVNEAKSTTVFSLI-----  
NRGKIPCAQEDPVKCGRLYCSLGNQLPCRFYPTDNEIGMVTDTGKTCGDKVCS-NRQCVDVNTAY-----  
NEKYIPCAQDVKCGRLFCDN-KKYPCHYDYS-EDDPDYGMDHGTCKADGKVCSNRQCVDVITAY-----  
NNVITPCQEDVKCGRLFCHT-KKSECFDFDYS-VDPDYGMDHGTCKADGKVCSNRQCVDVITAY-----  
NNVITPCQEDVKCGRLFCHT-KKSECFDFDYS-VDPDYGMDHGTCKEEGKVCNSNRQCVDVITAY-----  
NGVNIPCAKEVKCGRLFCDN-KKYPCHYNYS-VDPDFGMVLGTCADGKVCSNRQCVDVITAY-----  
NGVNIPCAKEVKCGRLFCDN-KKYPCHYNYS-VDPDFGMVLGTCADGKVCSNRQCVDVITAY-----

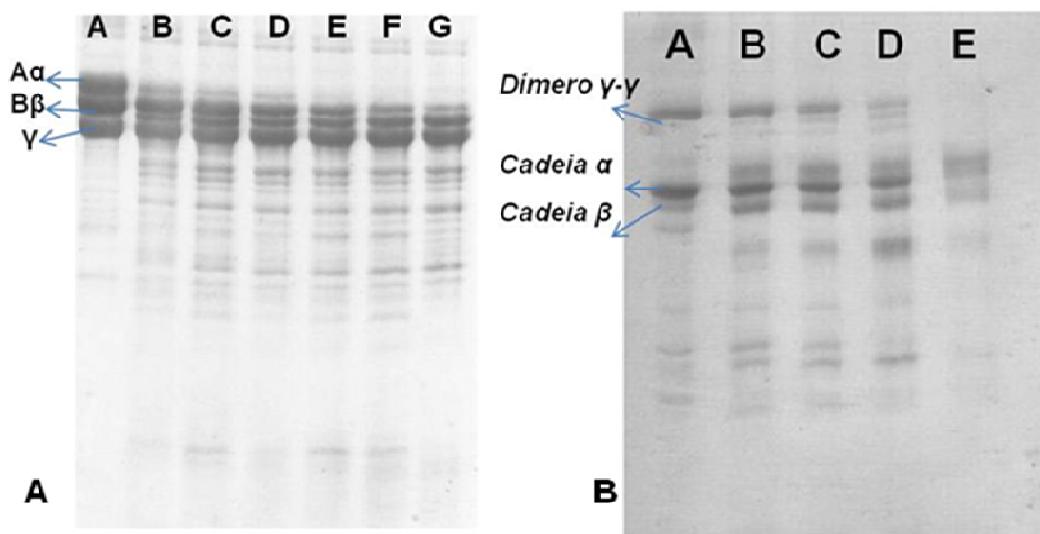
**Figura 4:** Alinhamento da sequência parcial peptídica da *Botropoidina* com algumas sequências homólogas a metaloproteases PIII encontradas em bancos de dados (NCBI) e no transcriptoma de *B. pauloensis* (Rodrigues *et al.*, 2012). (Q98UF9.3) HF3 - *B. jararaca*; (AFJ49243.1) Metaloprotease 5 - *Crotalus adamanteus*; (P20164) Trimerelisina I - *Trimeresurus flavoviridis*; (Q8JIR2.1) HR1a - *Trimeresurus flavoviridis*; (AEJ31991.1) Metaloprotease 8 - *Crotalus adamanteus*; (ADO21501.1) MPIII1 - *B. neuwiedi*; (ADO21502.1) MPIII-2 - *B. neuwiedi*; (ADO21503.1) MPIII-3 - *B. neuwiedi*; (GR955266.1) BP047 - *B. pauloensis*; (GR955267.1) BP048 - *B. pauloensis*; Botropoidina (fragmentos obtidos por LC-MS/MS). Os símbolos mostrados nas sequências representam as regiões características das metaloproteases da classe PIII. (\*) Domínio metaloprotease; (●) domínio *desintegrina-like*; (■) domínio rico em cisteína. Os resíduos de cisteína estão marcados em cinza. A caixa demonstra a sequência de aminoácidos ECD. O alinhamento acima foi gerado pelo programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007).



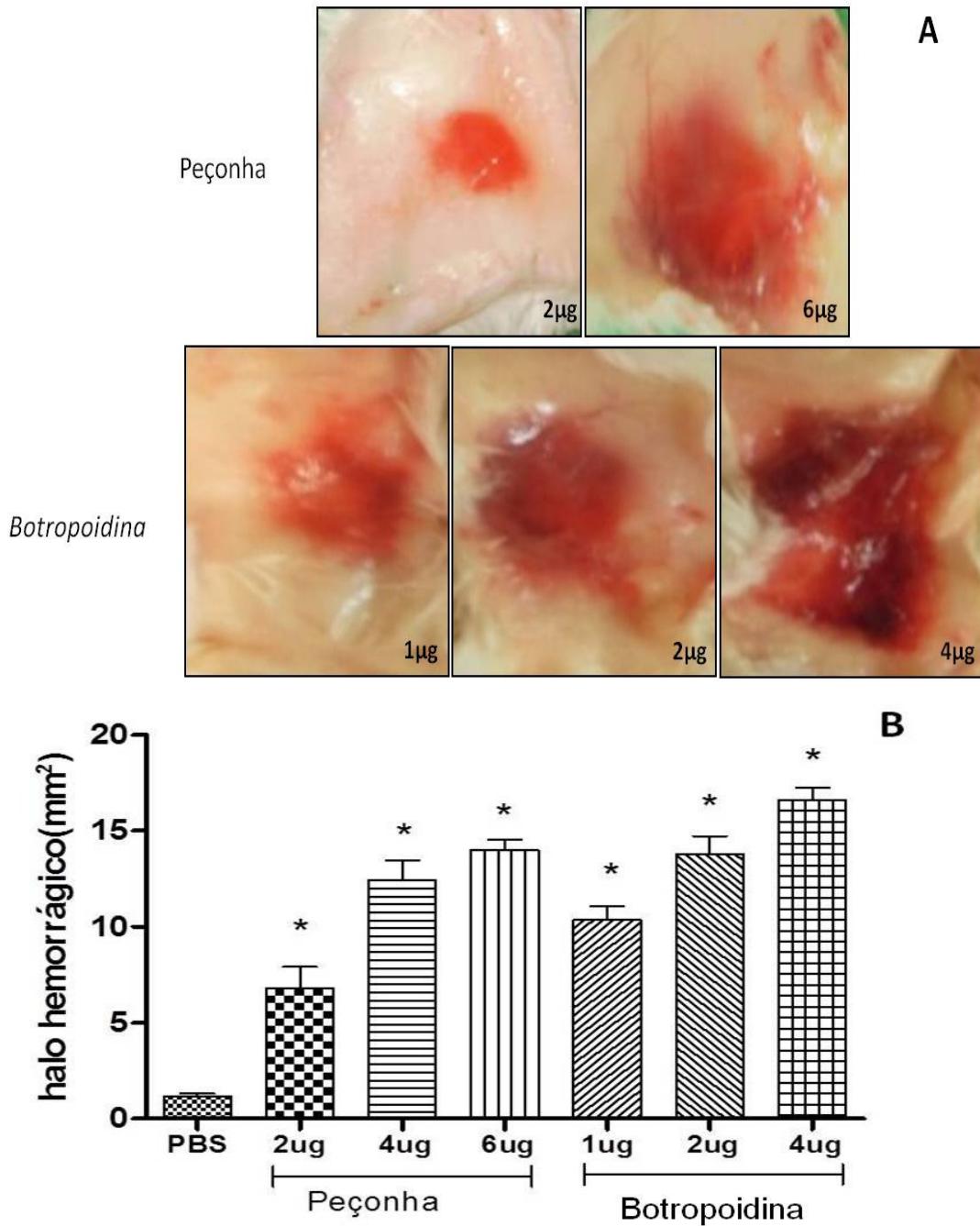
**Figura 5:** Atividade azocaseinolítica. Efeito da presença de agentes quelantes, inibidores de proteases e íons metálicos na atividade azocaseinolítica da metaloprotease *Botropoidina*. Os agentes quelantes, inibidores e íons metálicos a uma concentração de 10 mM foram pré-incubados separadamente com 5 µg da protease por 1h a 37ºC e posteriormente incubados com 400µL da solução de azocaseína (1.5 mg/mL) em Tris-HCl 20mM, pH 7.4, contendo CaCl<sub>2</sub> 5mM por 60 min. a 37ºC. A reação foi interrompida pela adição de 100µL de ácido tricloro acético a 10% (v/v). Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,01 unidades de absorbância a 405nm em relação às condições do ensaio controle. Os dados representam a media ± S.E. (n=3). \* Diferenças estatísticas significantes comparadas com *Botropoidina* ( $p \leq 0.05$ ).



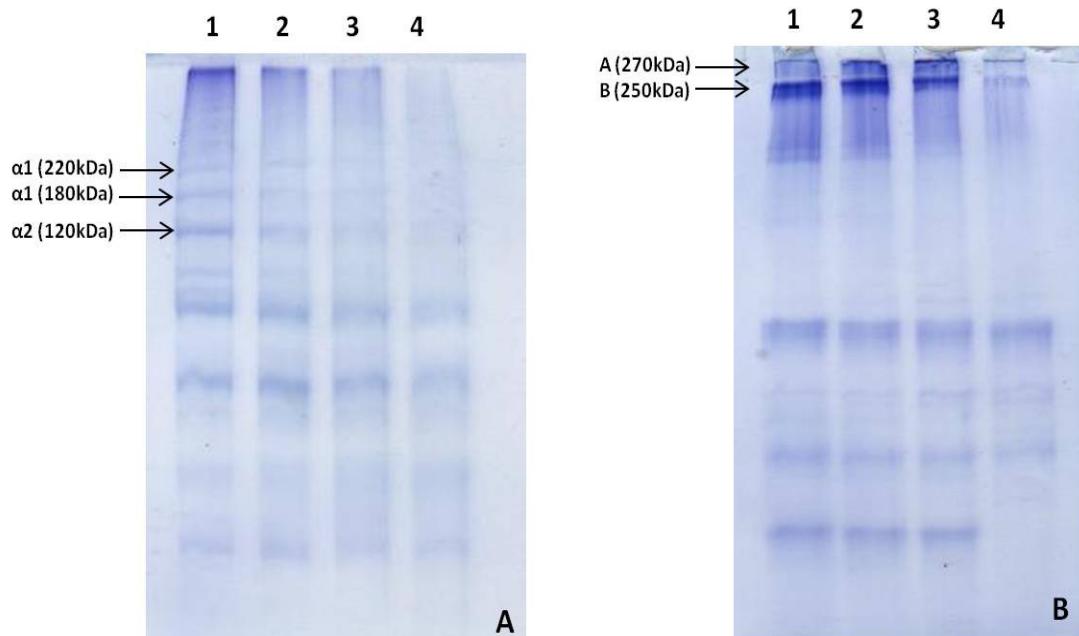
**Figura 6:** Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da atividade catalítica da metaloprotease *Botropoidina* sobre a azocaseína. (A) *Botropoidina* (5 µg) foi incubada por 1 h a 37 °C com soluções tampão de pH variando de 3-11. (B) *Botropoidina* (5 µg) foi incubada por 30 minutos a temperaturas variando de 20-80°C em Tris-HCl pH=7.4. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,01 unidades de absorbância a 405nm em relação às condições do ensaio controle. Os dados representam a media ± S.E. (n=3).



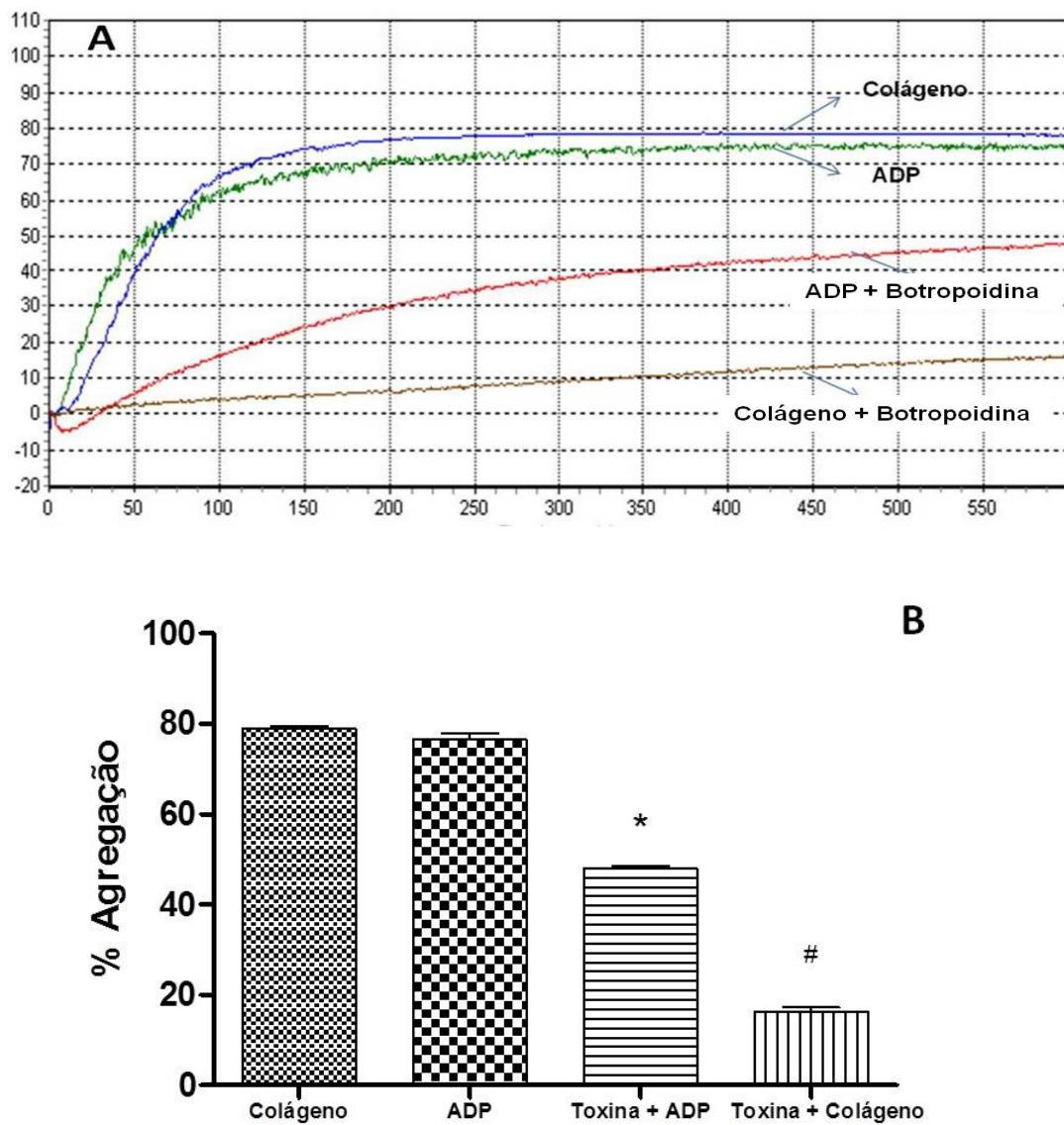
**Figura 7:** (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 13,5% com SDS dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pela *Botropoidina*. Para este ensaio 50 $\mu$ l de fibrinogênio (1,5mg/ml) foram incubados com 5 $\mu$ g de protease a diferentes intervalos de tempo. A- Fibrinogênio bovino controle incubado a 37°C por 2 h. B-G, Fibrinogênio bovino incubado com 5  $\mu$ g de *Botropoidina* por 5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos respectivamente. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 13,5% com SDS dos produtos de digestão da fibrina pela protease *Botropoidina* em diferentes intervalos de tempo. A- Fibrina controle. B-E: fibrina incubada com 5  $\mu$ g de *Botropoidina* por 2, 4, 6 e 12 h respectivamente.



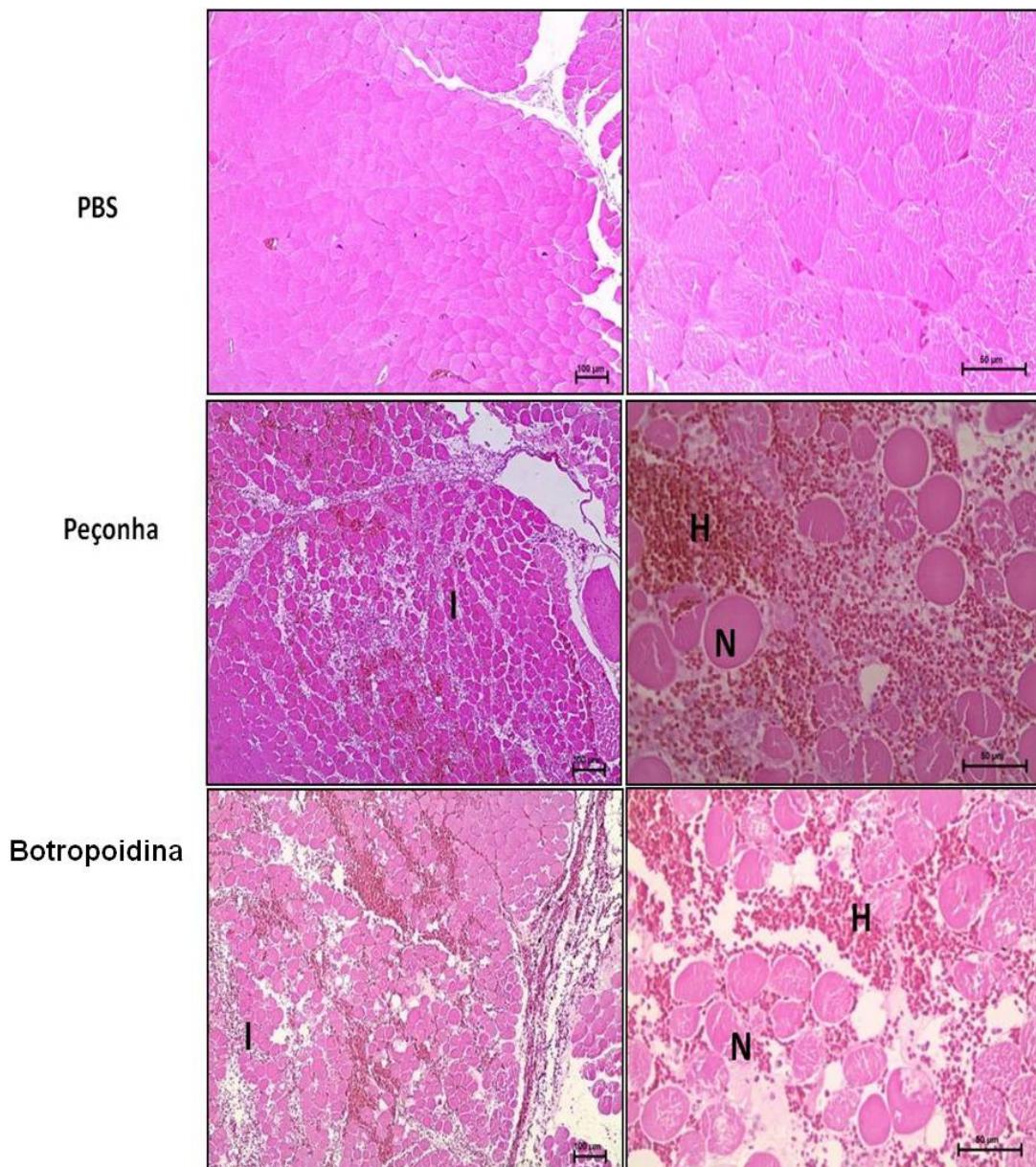
**Figura 8:** Hemorragia induzida por diferentes doses da peçonha bruta e pela toxina *Botropoidina*; (A) Fotos do halo hemorrágico de 2 e 4 $\mu\text{g}$  induzido pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e por 1, 2 e 4 $\mu\text{g}$  da toxina *Botropoidina*. (B) Halo hemorrágico induzido por diferentes doses da peçonha de *B. pauloensis* e da metaloprotease *Botropoidina*. Os resultados representam uma média de  $n=5$ . \*Diferenças significativas em relação a PBS ( $p \leq 0.05$ ).



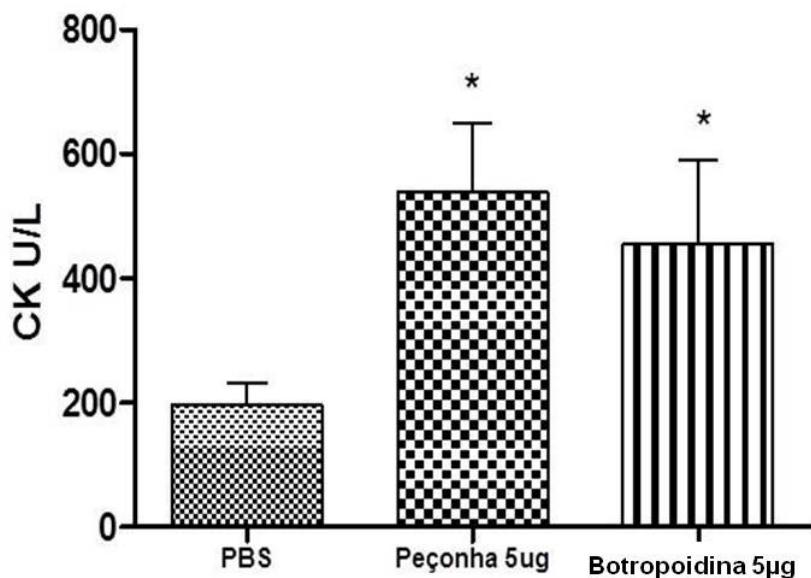
**Figura 9:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% com SDS dos produtos de digestão do colágeno tipo-IV (2,5mg/mL) e fibronectina (1,0 mg/mL) após incubação com 5  $\mu$ g de *Botropoidina* a 37°C por diferentes intervalos de tempo. (A) 1- Colágeno tipo-IV controle incubado a 37°C por 2 h. 2-4, Colágeno tipo-IV incubado com 5  $\mu$ g de *Botropoidina* por 2, 4 e 6 h respectivamente. (B) 1- fibronectina controle incubado a 37°C por 2h. 2-4: fibronectina incubada com *Botropoidina* por 2, 4 e 6 h respectivamente.



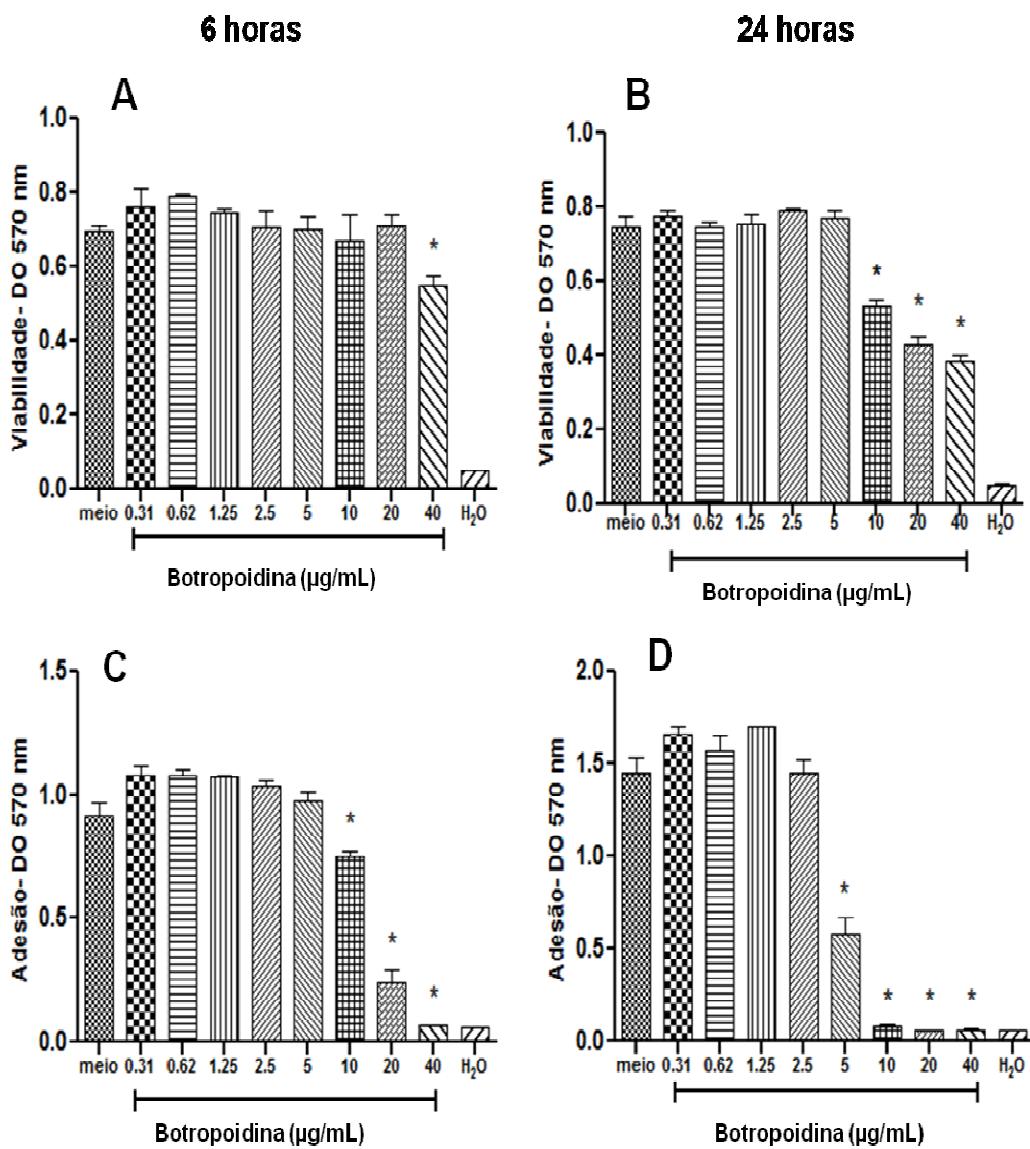
**Figura 10:** Atividade de agregação Plaquetária induzida pela *Botropoidina*. Soluções de plaquetas ( $3-4 \times 10^5/\mu\text{L}$ ) foram pré-incubadas por 15 minutos com *Botropoidina* (5 $\mu\text{g}$ ) sendo em seguida adicionados os agonistas colágeno (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou adenosina difosfato - ADP (5mM). Como controle foram utilizados ADP (5mM) ou colágeno (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). (A) Gráfico representativo da atividade de agregação plaquetária. (B) Gráfico da porcentagem de agregação plaquetária. \*Diferenças significativas em relação ao ADP e # em relação ao colágeno.



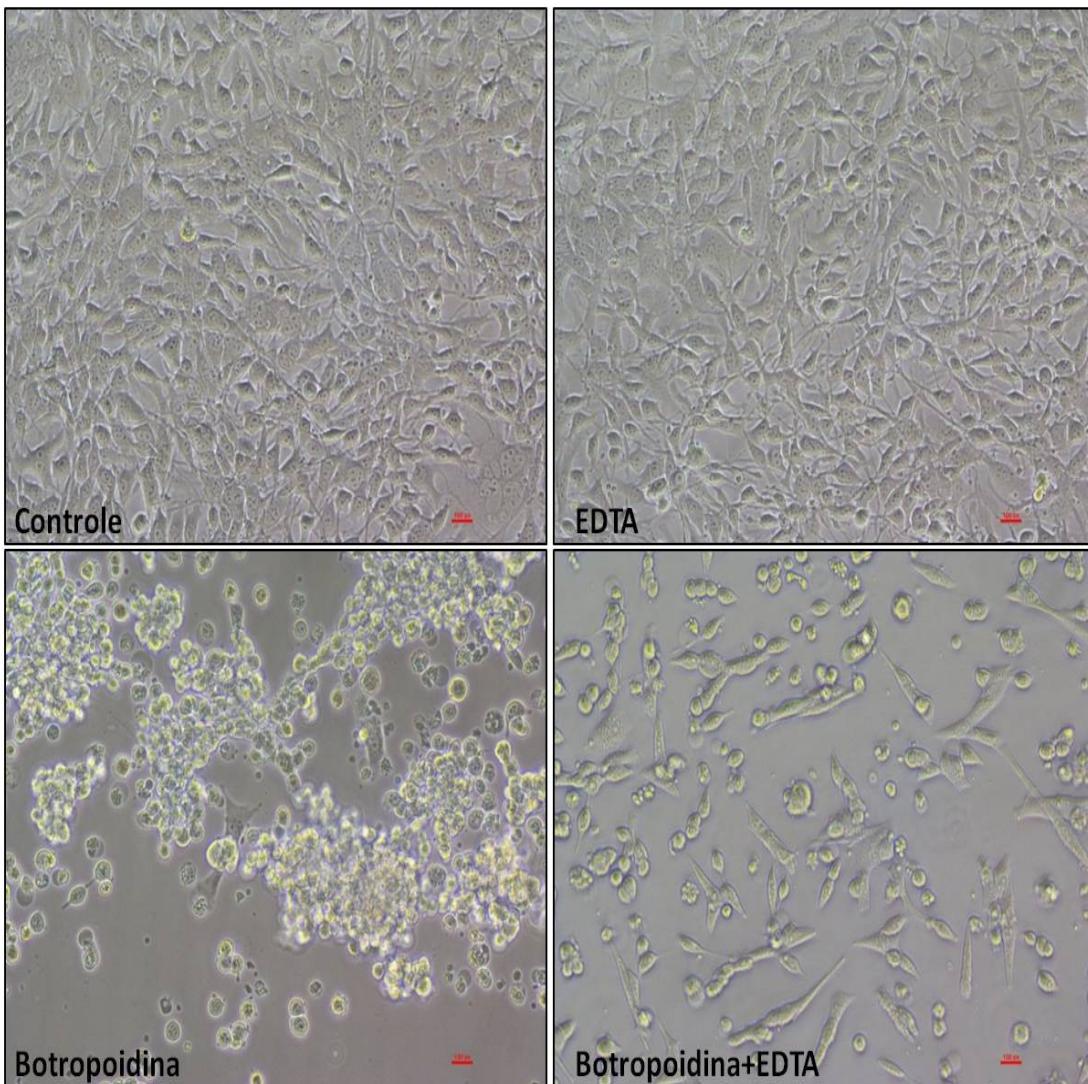
**Figure 11:** Fotomicrografias de cortes transversais de 2,5 µm de espessura do músculo gastrocnêmio de camundongos Swiss ( $n=3$ ) injetados com 5µg da metaloprotease *Botropoidina* ou com a peçonha de *B. pauloensis* por via intramuscular. Os animais controle receberam apenas PBS. Coloração: hematoxilina e eosina. Observar a presença de **H**= hemorragia; **I**= Infiltrado leucocitário; **N**= células em processo de necrose.



**Figura 12:** Níveis plasmáticos da enzima creatina cinase (C.K) obtidos após 3 horas da injeção de 5 $\mu$ g de *Botropoidina* ou 5 $\mu$ L da peçonha de *B. pauloensis* por via i.m no músculo gastrocnêmio. Como controle foi utilizado PBS e atividade foi expressa em U/L. Os valores representam a média  $\pm$  SE do experimento realizado em triplicata n=3. \* Diferenças estatisticamente significativa em relação ao controle PBS ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 13:** Efeito da *Botropoidina* na viabilidade e adesão de células tEnds. As células foram tratadas com diferentes concentrações de *Botropoidina* por 6 e 24 horas. Após os tempos de tratamento, a viabilidade (A,B) e a adesão celular (C,D) foram determinadas conforme descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam a média  $\pm$  SE do experimento realizado em triplicata n=3. \* Diferenças estatisticamente significativas em relação ao meio ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 14:** Microscopia de contraste de fase de células tEnd. As células tEnd foram tratadas com *Botropoidina* (20 $\mu$ g/mL), *Botropoidina* inativada por EDTA (1 $\mu$ g/mL), ou EDTA (1mM) e examinadas ao microscópio de luz 24h após o tratamento. Aumento (200X).

## *Capítulo III*

---

# *Purificação e caracterização funcional de uma nova metaloprotease (*BleucMP*) da peçonha da serpente de *Bothrops leucurus**

---

Publicado em:

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 153 (2011) 290–300

---



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cbpc](http://www.elsevier.com/locate/cbpc)



## RESUMO

Neste trabalho, uma metaloprotease não hemorrágica e fibrin(ogen)olítica (*BleucMP*) foi purificada da peçonha da serpente de *Bothrops leucurus* em dois passos cromatográficos: DEAE-Sephadex A-25 e CM-Sepharose Fast Flow. *BleucMP* representa 1,75% (m/m) da peçonha bruta e mostrou-se hemogênea em SDS-PAGE. A análise de *BleucMP* por MALDI TOF/TOF,reveleu uma massa molecular de 23057,54Da e quando alquilada e reduzida sua massa é de 23830.40Da. A análise dos peptídeos gerados por MS (MALDI TOF/TOF) que mostraram score significantes foi comparado com outras proteínas usando NCBI-BLAST2 *alignment display*. Em relação à atividade proteolítica, *BleucMP* foi eficiente sobre fibrinogênio, fibrina e azocaseína, e foi inibida por EDTA e 1,10-fenantrolina. Esta enzima também foi capaz de diminuir significativamente os níveis de fibrinogênio plasmático, tornando assim o sangue incoagulável. No entanto foi desprovida de atividade hemorrágica quando testada na pele de camundongos e não induziu relevantes alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas em camundongos. Os aspectos abordados neste trabalho fornecem dados sobre o efeito da *BleucMP* no envenenamento de serpentes do gênero *Bothrops leucurus*, a fim de melhor compreender a ação das metaloproteases no envenenamento causado por serpentes.

*Palavras Chaves:* *Bothrops leucurus; veneno de serpente; metaloprotease; Fibrin(ogen)olitica.*

### **Abstract**

A fibrino(geno)lytic nonhemorrhagic metalloproteinase (BleucMP) was purified from *Bothrops leucurus* snake venom by two chromatographic steps procedure on DEAE-Sephadex A-25 followed by CM-Sepharose Fast Flow column. BleucMP represented 1.75% (w/w) of the crude venom and was homogeneous on SDS-PAGE. BleucMP analyzed by MALDI TOF/TOF, showed a molecular mass of 23,057.54 Da and when alkylated and reduced, the mass is 23,830.40 Da. Their peptides analyzed in MS (MALDI TOF\TOF) showed significant score when compared with those of other proteins by NCBI-BLAST2 alignment display. As regards their proteolytic activities, BleucMP efficiently acted on fibrinogen, fibrin, and was inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline. This enzyme was also able to decrease significantly the plasma fibrinogen level provoking blood incoagulability, however was devoid of hemorrhagic activity when tested in the mice skin and did not induce relevant biochemical, hematological and histopathological alterations in mice. The aspects addressed in this paper provide data on the effect of BleucMP in envenomation from *B. leucurus* snakes in order to better understand the effects caused by snake venom metalloproteinase.

**Keywords:**    *Bothrops leucurus;*    *Snake venom;*    *Metalloproteinase;*  
*Fibrin(ogen)olytic.*

## **1. Introduction**

Brazil is a large country and there are occurrences of snakes in virtually anywhere throughout its area, and more than 90% of snakebites reported correspond to the genus *Bothrops* (Ramos and Selistre-de-Araujo, 2006). The bothropic envenomations are characterized by prominent local tissue damage, with pain, edema, necrosis, hemorrhage and systemic alterations such as hemorrhage, renal failure and changes in blood clotting (Fernandes et al., 2006; Marsh and Williams, 2005; Marcussi et al., 2007; White, 2005). The venom produced by these snakes include a truly biochemical arsenal, consisting of several enzymes with activity that have aroused the curiosity of researchers for centuries, in an attempt to understand its systemic action in order to get a pharmacologically application (Swenson and Markland, 2005; White, 2005; Ramos and Selistre-de- Araujo, 2006).

Among the various components of snake venoms, the metalloproteinases, present particular interest due to their possible pharmaceutical clinical applications, mainly by interfering in the hemostatic system. Over the past 50–60 years, many of these enzymes have been purified from the crude venom and their characterization has demonstrated an important role associated with the pathology of envenomations and many of these studies indicate these enzymes as possible clinical application, associated with the development of new drugs especially when interacting with the blood clotting system (Braud et al., 2000; Matsui et al., 2000; Toombs, 2001; Lee Ho et al., 2002; Marsh and Williams, 2005; White, 2005; Koh et al., 2006; Boukhalfa-Abib et al., 2009; Fox and Serrano, 2009). The metalloproteinases from snake venoms (SVMPs) are synthesized in the glands as pro-enzymes with a preserved zinc-proteinase domain (HEBxHxBGBxHD). In its catalytic site the zinc ion is coordinated by three histidine residues and it is essential for the action of the catalytic SVMPs (Stocker et al., 1995; Stroka et al., 2005; Swenson and Markland, 2005; Moraes and Selistrede- Araujo, 2006; Ramos and Selistre-de-Araujo, 2006). The SVMPs shared structural and functional motifs with other metalloproteinases, such as MMPs (Matrix Metalloproteinases) and ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) (Stocker et al., 1995). They are

classified from PI to PIII according to their domains (Reviewed by Fox and Serrano, 2008). The mature form of the PI class is composed only by the metalloproteinase domain, which can show weak or non-hemorrhagic activity, whereas P-II and P-III SVMPs exhibit additional non-catalytic domains, such as disintegrin, disintegrin-like and cysteine-rich domains.

In general, these classes of SVMPs can cause potent hemorrhage, as well as the jararhagin a highly hemorrhagic P-III SVMP (Baldo et al., 2010). Over the recent decades, many of the snake venoms metalloproteinases have been purified and characterized. These proteases have been the subject of studies due their role in various pathologies of envenoming mainly in the disorders related to the process of hemostasis. In particular, the PI class metalloproteinase present a significant possibility of therapeutic application in disorders involving the vascular coagulation, in view of its low toxicity and a direct effect on fibrinogen and fibrin, as well as other factors from hemostatic system (Bjarnason and Fox, 1994; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Fox and Serrano, 2005; Stroka et al., 2005; Swenson and Markland, 2005; Castroe and Parkinson, 2006). Bothrops leucurus snake frequently occurs in the Atlantic forest of Brazil, from the northern state of Espírito Santo as far as the coast of Ceará (Prianti et al., 2003). In particular, the state of Bahia (northeastern Brazil) has a high occurrence of this species, responsible for the vast majority of snakebites (Lira-da-Silva et al., 2009). In this study we show the isolation and functionally characterization of a new fibrinogenolytic and nonhemorrhagic metalloproteinase from *B. leucurus* snake venom.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Venom and animals**

*B. leucurus* venom was purchased from CEPLAC (Bahia, Brazil), were lyophilized and stored at -10 °C in the Laboratory of Protein Chemistry. Male Swiss mice (*Mus musculus*) were kindly provided by the Institute Vallé (Minas Gerais, Brazil) and maintained under standard conditions (temperature 22±1 °C, relative humidity 60± 5%, 12 h light/dark cycle) with diet and water ad libitum. The procedures involving animal experiments were approved by the Federal University

of Uberlandia (Minas Gerais, Brazil) Committee for ethics in Animals Experimentation (number of protocol 047/09).

## **2.2. Reagents**

DEAE-Sephadex A-25 and CM-Sepharose fast flow were purchased from Amersham Biociences. Acrylamide, ammonium persulfate, aprotinin, bromophenol blue, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), benzamidine, bovine fibrinogen, human thrombin,  $\beta$ -mercaptoethanol, N,N'-methylene-bis-acrylamide, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 1,10-phenanthroline, sodium dodecyl sulfate(SDS) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals and reagents used in this work were of analytical grade.

## **2.3. Purification of the metalloproteinase BleucMP**

*B. leucus* venom (220 mg) was dispersed into 2.0 mL of 0.05 M ammonium bicarbonate buffer (AMBIC), pH 7.8, cleared by centrifugation at 10,000 g for 10 min and applied on DEAE-Sephadex A-25 column (1.4×29 cm) which was previously equilibrated and initially eluted with the same buffer (0.05 M, pH 7.8 of AMBIC). The gradient of 0.05–0.5 M, was established after fraction 40, equivalent to 80 mL of column washing (flow rate of 20 mL/h). The fractions (5–19) comprising the first protein peak (named D1 fraction) were combined, lyophilized, dissolved in 0.05 M, pH 7.8 ammonium bicarbonate buffer and applied on a CM-Sepharose fast flow column (1.4×26 cm), previously equilibrated with the same buffer and eluted with a concentration gradient (0.05–0.4 M). The gradient of 0.05–0.4 M, was established after fraction 50, at a flow rate of 20 mL/h. The fraction CM3 (named BleucMP) was collected, concentrated and stored at 4 °C for subsequent biochemical analysis. All steps of the purification procedure were carried out at room temperature (25 °C). BleucMP sample of 500  $\mu$ g was diluted in 500 $\mu$ L of solvent A (0.1% trifluoroacetic acid and 5% acetonitrile) and analyzed on RP-HPLC using a C2C18 column of 2.0×2.5 cm (GE Health Care), equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid and 5% acetonitrile) and eluted with a concentration gradient of solvent B (80% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) from 0 to 100% at a flow rate of 0.5 mL/ min at room temperature

## **2.4. Biochemical characterization**

### **2.4.1. Determination of Mr**

12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli (1970). Mr was estimated by interpolation from a linear logarithmic plot of relative molecular mass versus distance of migration. The molecular mass markers used were: Bovine serum albumin (66 kDa), valbumin (45 kDa), glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic Anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa),  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa) (Amersham Biosciences). Proteins were estimated by the method of Bradford (1976).

### **2.4.2. MALDI TOF/TOF mass spectrometry and bioinformatics**

S-pyridylethylated protein sample (300  $\mu$ g) was dissolved in 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8.1 and incubated with 2% trypsin (w/w) (Promega, Madison, WI, USA) for 3 h at 37 °C. The digest was concentrated in a Speed-Vac concentrator and 1  $\mu$ L was applied onto an AnchorChip™ 384/600 target (Bruker Daltonics, Germany) and mixed into 1  $\mu$ L of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) and left to air dry. After that, the crystals were washed with 10  $\mu$ L of Milli Q water to remove salts. Protein digest was subjected to peptide mass fingerprinting on a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Autoflex II, Bruker Daltonics, Germany), in positive and reflector mode, after external calibration using a standard mixture of peptides. Selected peaks were used for searches and identification, and one of the identified peptide was subjected to MS/MS fragmentation. MS/MS fragmentation was carried out using the LIFT technique, which, combined to PMF, increased the identification rate (Suckau et al., 2003). Mass spectra were analyzed using FlexAnalysis and Biotools software (Bruker Daltonics). Protein identification was performed using Mascot software (Perkins et al., 1999). The searches were performed against the NCBI database (Johnson et al., 2008) with 100 ppm mass tolerance and fragmentation mass tolerance of 0.5 Da. The search parameters were restricted to Chordata and allowed one missed cleavage, S-pyridylethylation of cysteines as fixed modification and oxidation of methionine as variable

modification. The peptide fragments generated were aligned using the program BLAST bioinformatics ([www.ebi.ac.uk/Tools/blastall/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/blastall/)).

## **2.5. Enzymatic activity**

### **2.5.1. Proteolytic activity upon fibrinogen**

Fibrinogenolytic activity was assayed as described by Rodrigues et al. (2000), with brief modifications. Samples of 50 µL of bovine fibrinogen (1.5 mg/mL PBS) were incubated with 5 µg of the enzyme for different periods of time (1, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min.) at 37 °C. The reaction was stopped with 25 µL of 0.05 M, pH 8.8, Tris–HCl buffer containing 10% (v/v) glycerol, 10% (v/v) β-mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, and 0.05% (w/v) bromophenol blue. The samples were then analyzed by 12% (w/v) SDS-PAGE. The effect of inhibitors on the fibrinogenolytic activity was assayed after preincubation of the enzyme (5 µg) with 10 µL of 20 mM EDTA, 1,10-phenanthroline, aprotinin, and benzamidine. The effect of β-mercaptoethanol on fibrinogenolytic activity was also evaluated.

### **2.5.2. Azocaseinolytic activity**

Samples of 10 µg of BleucMP and *B. leucurus* crude venom were incubated with 2 mL of azocasein solution (1 mg/mL) in 0.2 M Tris–HCl, pH 8.0, 4 mM CaCl<sub>2</sub> for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 3 mL of 5% (v/v) trichloroacetic acid (TCA) and the mixture was left standing for 20 min at room temperature before centrifugation (10.000 g) for 10 min. The proteolytic activity was estimated by reading the absorbance of the clear supernatant at 366 nm. One unit azocaseinolytic activity was defined as the amount of enzyme which produces an absorbance increase of 0.01 units per minute.

The effect of inhibitors on the azocaseinolytic activity was assayed after preincubating 10 µg of the enzyme for 30 min at 37 °C with 10 MI of EDTA, 1,10-phenanthroline, aprotinin, β-mercaptoethanol and benzamidine (all 20 mM).

### **2.5.3. Proteolytic activity upon fibrin**

Proteolytic activity upon fibrin clots was assessed as described by Gremski et al. (2007) with modifications. Briefly, 5 NIH units/mL human thrombin (Sigma)

were added to 2.5 mg/mL bovine fibrinogen (Sigma) in 500 µL of 0.2 MTris/HCl, pH 8.0, with 20 mM CaCl<sub>2</sub> at room temperature. Immediately after mixing, 100 µL of the polymerizing solution were transferred to 0.5 mL microcentrifuge tubes. After 2 h, each solution was treated with 20 µL (10 µg) of the enzyme in same buffer and incubated for different time intervals (30, 45, 60, 120 and 180 min.) at 37 °C, followed by the addition of 60 µL of denaturing solution containing 2% SDS; 5% β-mercaptoethanol; 10% glycerol and 0.005% bromophenol blue, for SDS-PAGE (12%) analysis.

#### **2.5.4. Defibrinogenating activity**

Defibrinogenating activity was carried out by the method of Gene et al. (1989) with some modifications. Briefly, groups of male Swiss mice (20–25 g, n=4) were injected i.p. with 10 µg crude venom or 50 µg of BleucMP/50 µL saline. Control animals received only 50 µL saline. After 3 h the animals were sacrificed with overdose of ketamine/xylazine (ket-a-xyl®) and bled by cardiac puncture. Whole blood was placed in glass tubes and kept at 25–30 °C. The remaining pro-coagulant activity of these plasmas was determined in a micro-processor Quick-Timer analyzer (DRAKE LTDA).

#### **2.5.5. Plasma fibrinogen determination**

The plasma fibrinogen was measured by kit commercial Hemostat Fibrinogen according to the manufacturer's instructions (Human of Brazil). Groups of four male Swiss mice (20–25 g) were injected i.p. With 10 µg crude venom and 50 µg of BleucMP (dissolved in 50 µL of saline); control animals received 50 µL of saline. After 3 h, animals were sacrificed with overdose of ketamine/xylazine (ket-a-xyl®) and bled by cardiac puncture. The plasma fibrinogen concentration was determined by clotting time after obtained the plasma in the presence of citrate. The tests were performed in a micro-processor Quick-Timer analyzer (DRAKE LTDA).

### **2.5.6. Hemorrhagic activity**

This activity was carried out as described by Nikai et al. (1984), with some modifications. Male Swiss mice (20–25 g) were distributed in groups of five animals and received i.d. injections in the dorsal region of different doses of 50 µg BleucMP or 10 µg crude venom and diluted in 25 µL of saline. After 3 h the animal were sacrificed with overdose of ketamine/xylazine (ket-a-xyl®). Their skins were removed and the hemorrhagic halo was then measured with a digital caliper DIGMESS 100.174BL. The control group received only 25 µL of saline.

### **2.5.7. Edema-inducing activity**

Groups of five male Swiss mice (20–25 g) were injected in the subplantar region with crude venom (10 µg/25 µL saline) or BleucMP (50 µg/25 µL saline). After 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 6 and 24 h, the paw edema was measured with the aid of a low-pressure SPRING CALIPER DIGMESS 100.174BL. The values were then subtracted from the initial measurement (time zero) and the differences reported as mean±S.D.

### **2.5.8. Biochemical and hematological parameters**

Crude venom (10 µg/50 µL saline) and BleucMP (50 µg/50 µL saline) samples were injected by i.p. route in male Swiss mice (20–25 g, n=3), after 3 h the animal were sacrificed with overdose of ketamine/xylazine (ket-a-xyl®) and bled by cardiac puncture. Blood was collected in the presence of EDTA and centrifuged at 2.000 g for 20min at 4 °C. The plasma was used to quantify creatine kinase (2.7.2.2), creatinine, aspartate aminotransferase (ASA; EC 2.6.1.1; IU/L) and alanine aminotransferase (ALAT; EC 2.6.1.2; IU/L (Biotécnica, Brazil). An automatized cell counter (Sysmex LX-21N) was used to quantify the leucocytes and under a light microscope. Histological alterations induced by BleucMP in various organs were analyzed in groups of four mice, which received i.p. injections of BleucMP (10 µg/50 µL saline). After 24 h, samples of kidneys, heart and liver were dissected out and processed as described.

### **2.5.9. Histological characterization of pathological effects**

Groups of four male Swiss mice (20–25 g) were i.m. injected in the right gastrocnemius with (50 µg or 10µg/25 µL saline) BleucMP or *B. leucurus* crude venom, respectively. Controls received saline only and 24 h later, the animals were sacrificed with overdose ketamine/xylazine (ket-a-xyl®). A small sample of the central portion of the muscle was removed and placed in a fixative solution containing 10% (v/v) formalin, dehydrated and included in paraffin. Five micrometer sections were cut in a microtome and stained with hematoxilin-eosin to be examined under a light microscope. Histological alterations induced by BleucMP in various organs were analyzed in groups of four mice, which received i.p. injections of BleucMP (10 µg/50 µL saline). After 24 h, samples of kidneys, heart and liver were dissected out and processed as described.

### **2.5.10. Statistical analysis**

The results were presented as means ± standard deviation (S.D.). Statistical significance of results was evaluated using t-Student's tests. Values of p< 0.05 was considered significant.

## **3. Results and discussion**

Snakes of the genus *Bothrops* (Viperidae) are targets of studies in Brazil both for their occurrence and prevalence. Besides, these venoms have a variety of enzymes which have action on hemostasis being target of studies for the production of new medicines (Matsui et al., 2000; Toombs, 2001; Marsh and Williams, 2005; White, 2005; Koh et al., 2006; Sanchez and Swenson, 2007). In Brazil, about 90% of snake bites are from the genus *Bothrops*. According to Bello et al. (2006), more than 90% of snakebites reported in 1990, the metropolitan region of Salvador, State of Bahia (Brazil) occurred with species of *Bothrops leucurus*, so this snake represents an important medical related snake venom poisoning in the northeast (Lira-da-Silva et al., 2009). In our study, we used *B. leucurus* snake venom obtained from the Atlantic Forest of the state of Bahia (Brazil).

Fractionation of *B. leucus* venom by ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25 column produced five major protein peaks (Fig. 1A). All fractions obtained throughout the purification process were assayed with fibrinogenolytic activity and SDS-PAGE. The fraction D1, which showed fibrinogenolytic activity was further fractionated on CM-Sepharose Fast Flow (Fig. 1B) and resolved into five protein new fractions, named CM1–CM5 (Fig. 1B). In this second chromatographic step we obtained a metalloproteinase named BleucMP (fraction CM3) (Fig. 1B).

This sample was analyzed by reverse-phase HPLC chromatography (Fig. 1D). The homogeneity of this metalloproteinase was further demonstrated by SDS-PAGE showing a single-chain protein of 23.500 Da and 23.100 Da in reduced and unreduced conditions, respectively (Fig. 1C). The molecular mass of BleucMP was also analyzed by mass spectrometry MALDI TOF/TOF, showing a native enzyme mass of 23,057.54 Da and when alkylated and reduced, the mass is at 23,830.40 Da. The molecular mass difference between the native enzyme and the reduced/alkylated one indicates that this metalloproteinase shows seven cysteine residues. The SVMps fromP-I class usually contains four, six or seven cysteine residues (Fox and Serrano, 2008).

For analysis of sequence compositions of the BleucMP, 300 $\mu$ g of enzyme were digested with trypsin. Afterwards, the sample was assessed in mass spectrometry MALDI TOF/TOF generating the spectrum of peptides (PMF: peptide mass fingerprinting). The spectrum was analyzed using the software program Matrix Science (Mascot Search Results) and revealed a score signification (Protein scores greater than 73 are significant pb0.05) (Fig. 2A). In order to confirm the peptide mass fingerprinting results, the peptide with an observed molecular mass of 1096.58 Da was subjected to MS/MS fragmentation (Fig. 2B). The MS/MS fragmentation of the peptide led to the confirmation of the sequence TLTSFGEWR with a total score of 48 (individual ions scoresN42 indicate identity or extensive homology—pb0.05) present in leucurolysin-A (gi| 114149951) from *Bothrops leucus*; (gi|187655925) in Zinc metalloproteinase bothrojaractivase from *Bothrops jararaca*; (gi|172044591) in Zinc metalloproteinase BaP1 from *Bothrops asper*; (gi|82115319) in Zinc metalloproteinase neuwiedase from

*Bothrops neuwiedi*. The fragment of the amino acids sequence which present a significant score (Fig. 3) was applied in the NCBI-BLAST2 alignment display ([www.ebi.ac.uk/Tools/blastall/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/blastall/)), showing the similarity of the fragments of BleucMP with other SVMPs, such as: 71% with Leuc-a (*Bothrops leucurus*), 69% BnP2 (*Bothrops neuwiedi*), 62% with BmooMP $\alpha$ -I (*Bothrops moojeni*), 60% with BaP1 (*Bothrops asper*), 57% with Neuwiedase (*Bothrops neuwiedi*) and 61% with Atroxase (*Crotalus atrox*), among other (Fig. 4). Based on the data from the structural analysis of mass and alignment of the peptide fragments, it can be suggest that the purified sample consists of a new SVMP variety which can be included into class P-I as proposed by Fox and Serrano, 2005, 2008.

SVMPs play an important role in the physiopathology of snake bite envenoming. They are directly involved in many of systemic and local damage. They can degrade fibrinogen and fibrin as well as activating factor V and Factor X of blood coagulation (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Matsui et al., 2000; Marsh and Williams, 2005; Swenson and Markland, 2005; Sanchez and Swenson, 2007; Berger et al., 2008). These enzymes are effective in degrading basement membrane components such as IV collagen and laminin affecting the stability of the endothelium, resulting in bleeding (Baldo et al., 2010). Moreover these enzymes can be responsible for many other effects after *Bothrops* envenomations such as inflammatory response and necrosis (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Gutiérrez et al., 2005; Marsh and Williams, 2005; Mazzi et al., 2007; Barbosa et al., 2008; Berger et al., 2008; Mukherjee, 2008; Lopes et al., 2009).

The enzymatic characterization of BleucMP was carried out by using different assays. The proteolytic activity of BleucMP was assessed upon azocasein, showing low activity when compared with *B. leucurus* crude venom (results not shown); however this activity was inhibited by chelating agents EDTA and 1,10-phenanthroline and remained active in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol, benzamidine and aprotinin (all 20mM) (Fig. 5C).

BleucMP when assayed upon fibrinogen was strongly active on the A $\alpha$  and B $\beta$  chains degrading more rapidly A $\alpha$  chain than B $\beta$  chain, in a time dependent manner, while the  $\gamma$  chain was unchanged (Fig. 5A). The A $\alpha$  chain degradation was detected and completed with only 1 min. For the B $\beta$  chain, the complete

degradation was after 60 min incubation (Fig. 5A). BleucMP fibrinogenolytic activity was completely inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline, and not inhibited by  $\beta$ -mercaptoethanol, benzamidine and aprotinin (all 20mM) (data not shown). BleucMP (10  $\mu$ g) was also able to degrade fibrin in a time-dependent manner (Fig. 5B). The fibrinolytic activity as evaluated by SDS-PAGE showed that the  $\beta$  chain was preferentially degraded.

The fibrin(ogen)olytic enzymes found in snake venoms can be classified into three groups, depending on the specificity of hydrolysis of the fibrinogen chains. The first group presents enzymes with hydrolysis preference for the  $\alpha$ -chain, the second for the  $\beta$ -chain and the third for the  $\gamma$  chain (Fox and Serrano, 2005; Swenson and Markland, 2005; Ramos and Selistre-de-Araujo, 2006). Moreover, most of the  $\alpha$ -fibrinogenases, which process the  $A\alpha$  chain of fibrinogen more rapidly than the  $B\beta$  chain, are  $Zn^{++}$  dependent metalloproteinases. This is also the case for BleucMP, whose  $Zn^{++}$  dependence was revealed by EDTA or 1,10-phenanthroline inhibition.  $\beta$ -mercaptoethanol was unable to inhibit the enzymatic action of BleucMP, indicating that a sulfide bonds does not interfere with the catalytic site. In addition, BleucMP is not expected to be a serine protease, since benzamidine and aprotinin which are serine protease inhibitors, did not alter BleucMP proteolytic activity. BleucMP (up to 20  $\mu$ g) was also devoid of phospholipase and coagulant activities on bovine plasma (data not shown). According to the pattern of enzymatic inhibition and fibrinogen degradation (Fig. 5A and C), BleucMP can be included in the class P-I SVMPs as a zinc-dependent  $\alpha$ -fibrin(ogen)olytic metalloproteinase.

Local tissue damage occurs rapidly after venom injection caused by *Bothrops* species and is characterized by hemorrhage, edema, myonecrosis, blisters and pain (Rucavado et al., 1998; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Rodrigues et al., 2001 and Gutiérrez et al., 2005). BleucMP (50  $\mu$ g) and *B. leucurus* venom (10  $\mu$ g) were evaluated by their capacity to induce edema, hemorrhage and myonecrosis. The pathogenesis of venom induced local effects is rather complex, involving the combined action of phospholipases A<sub>2</sub>, metalloproteinases and other venom components. Thus, the *B. leucurus* venom was tested with 10  $\mu$ g since 50  $\mu$ g of venom died all mice in the different biological

assays (present work). BleucMP showed a low edema-inducing effect. This action caused by SVMP has been attributed to degradation of proteins in the cell membrane and consequent release of inflammatory mediators and leukocyte infiltrate (Fig. 6A) (Rucavado et al., 1998; Gutiérrez et al., 2005; Lopes et al., 2009; Baldo et al., 2010). BleucMP also failed to induce hemorrhage on mice back skin when 50 µg of enzyme were intradermally injected (Fig. 6B and C).

When crude venom was injected i.m. in the gastrocnemius muscle, there was prominent hemorrhage and myonecrosis, with a conspicuous inflammatory infiltrate (Fig. 7A and B), whereas no histological alterations were observed in mice injected with saline (Fig. 7). When 50 µg BleucMP were injected i.m. no hemorrhage was observed, but there was slight myonecrosis concomitant with a low inflammatory reaction characterized by the presence of a polymorphonuclear leukocyte infiltrate (Fig. 7C and D). In envenomation, the role of metalloproteinases devoid of, or having very low, hemorrhagic activity has been traditionally viewed as almost irrelevant, these enzymes being considered as 'non-toxic' proteinases. However, some of these enzymes are able to cause moderate local tissue damage and inflammatory response characterized by a leukocytes infiltrate, MMP- 9 and cytokine production in muscle tissue. This is attributed also to proteolytic action of enzymes on proteins that composes the basement membrane (Rucavado et al., 1998; Rodrigues et al., 2001; Lopes et al., 2009; Baldo et al., 2010).

The results of biochemical, hematological and histological assays were evaluated after i.p. injections of BleucMP and *B. leucurus* venom (50 µg or 10 µg/50 µL saline), respectively. The histological analysis revealed morphological alterations in different organs analyzed (cardiac, liver and kidney tissues). *B. leucurus* venom showed a drastic myonecrotic activity, inflammatory infiltration, hemorrhage and extensive destruction of cells. BleucMP provoked low inflammatory infiltrate in heart and liver tissues (Figs. 8 and 9). In renal tissue crude venom *B. leucurus* presented tubular degeneration and an important inflammatory infiltration, while BleucMP has no significant change (data not shown). Additionally, BleucMP did not induce alterations on transaminases, creatine kinase, creatinine, leukocytes and platelets levels (data not shown).

BleucMP caused defibrinogenation when administered i.p. in mice, making the plasma incoagulable (results not shown). The plasma fibrinogen concentration decreased significantly when the crude venom or BleucMP (10 µg or 50 µg/50 µL saline), respectively, were injected by i.p. route in mice (Fig. 10). It is well known that the venom contains other many proteases (metallo and serine proteases) with procoagulant and defibrinogenating activity (Sanchez and Swenson, 2007; Berger et al., 2008; Wagstaff et al., 2009). The defibrinogenation action of BleucMP, combined with ability to degrade fibrin, fibrinogen are aspects that show the important role of this proteolytic action of BleucMP in envenomation caused by *Bothrops leucurus*.

In summary, our data showed that BlecMP, a 23057.54 Da class P-I metalloproteinase from *B. leucurus* venom, has an efficient proteolytic action over fibrinogen. BleucMP was also unable to induce hemorrhagic activity when tested in the skin mice and showed a low toxicity as regarding to biochemical and histopathological analysis. Future studies with BleucMP can reveal structural details which could lead to its use in part as a molecular model for clinical purposes mainly in the treatment and prevention of cardiovascular disorders and strokes.

### **Conflicts of interest**

No conflict interest of any authors.

### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico(CNPq), Universidade Federal de Uberlândia (UFU) and Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia(UESB), Brazil. As well as the skillful technical assistance of Dr. Antonio Mundim in the biochemical and hematological analysis and Dr. Marcelo Belleti for assistance in the histological studies.

## **References**

- Baldo, C., Tanjoni, I., Leon, I.R., Batista, I.F.C., Della-Casa, M.S., Clissa, P.B., Weinlich, R., Lopes-Ferreira, M., Lebrun, I., Amarante-Mendes, G.P., Rodrigues, V.M., Perales, J., Valente, R.H., Moura-da-Silva, A.M., 2008. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon* 51, 54–65.
- Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T.M., Moura-da-Silva, A.M., 2010. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metallproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 4 (6), e727.
- Barbosa, A.M., Villaverde, A.B., Guimarães-Souza, L., Ribeiro, W., Cogo, J.C., Zamuner, S.R., 2008. Effect of low-level laser therapy in inflammatory response induced by *Bothrops jararaussu* snake venom. *Toxicon* 51, 1236–1244.
- Bello, C.A., Hermogenes, A.L.N., Magalhaes, A., Veiga, S.S., Germski, L.H., Richardson, M., Sanchez, E.F., 2006. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie* 88, 189–200.
- Berger, M., Pinto, A.F.M., Guimarães, J.A., 2008. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 51, 488–501.
- Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Costa, T.R., Gomes, M.S.R., Torres, F.S., Costa, J., Borges, M.H., Richardson, M., Santos, D.M., Pimenta, A.M.C., Homsi-Brandeburgo, M.I., Soares, A.M., Oliveira, F., 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 51, 574–584.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. Haemorrhagic metalloproteinase from snake venom. *Pharmacol. Ther.* 62, 325–372.
- Boukhalfa-Abib, H., Meksem, A., Laraba-Djebari, F., 2009. Purification and biochemical characterization of a novel hemorrhagic metalloproteinase from horned viper (*Cerastes cerastes*) venom. *Comp. Biochem. Physiol. C* 150, 285–290.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248–254.

Braud, S., Bon, C., Wisner, A., 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 82, 851–859.

Castroe, T.A., Parkinson, C.L., 2006. Bayesian mixed models and the phylogeny of pipvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol Phylogenet Evol* 39, 91–110.

Fernandes, C.M., Zamuner, S.R., Zuliani, J.P., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., 2006. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon* 47, 549–559.

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

Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* 275, 3016–3030.

Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2009. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *J Proteomics* 72, 200–209.

Gene, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L., 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venom and their neutralization by polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841–848.

Gremski, L.H., Chaim, O.M., Paludo, K.S., Sade, Y.B., Otuki, M.F., Richardson, M., Gremski, W., Sanchez, E.F., Veiga, S.S., 2007. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Toxicon* 50, 120–134.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, 841–850.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997–1011.

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 36, W5–W9.

Koh, D.C.I., Armugan, A., Jeyaseelan, K., 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 3030–3041.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lee Ho, P., Serrano, S.M.T., Chudzinski-Tavassi, A.M., Moura-da-Silva, A.M., Mentele, R., Caldas, C., Oliveira, M.L.V., Batista, I.F.C., Sarno de Oliveira, M.L., 2002. Angiostatin like molecules are generated by snake venom metalloproteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 879–885.

Lira-da-Silva, R.M., Mise, Y.F., Casais-e-Silva, L.L., Ulloa, J., Hamdan, B., Brazil, T.K., 2009. Snakes of medicinal importance in Northeast of Brazil. *Gaz. méd. Bahia* 79, 7–20.

Lopes, D.S., Baldo, C., Oliveira, C.F., Alcântara, T.M., Oliveira, J.D., Gourlart, L.R., Hamaguchi, A., Homsi-Brandeburgo, M.I., Moura-da-Silva, A.M., Clissa, P.B., Rodrigues, V.M., 2009. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. *Toxicon* 54, 42–49.

Marcussi, S., Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Mazzi, M.V., Oliveira, C.Z., Izidoro, L.F.M., Fuly, A.L., Magno, A.J., Braz, A.S.K., Fontes, M.R.M., Giglio, J.R., Soares, A.M., 2007. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides* 28, 2328–2339.

Marsh, N., Williams, V., 2005. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* 45, 1171–1181. Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1477, 146–156.

Mazzi, M.V., Magro, A.J., Amui, S.F., Oliveira, C.Z., Ticli, F.K., Stábeli, R.G., Fuly, A.L., Rosa, J.C., Braz, A.S., Fontes, M.R., Sampaio, S.V., Soares, A.M., 2007. Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjussuMP-I: a RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J. Mol. Graph. Model.* 26, 69–85.

Moraes, C.K., Selistre-de-Araujo, H.S., 2006. Effect of rACLF, a recombinant snake venom metallopeptidase on cell viability, chemokine expression and degradation of extracellular matrix proteins. *Toxicon* 48, 641–648.

Mukherjee, A.K., 2008. Characterization of a novel pro-coagulant metalloprotease (RVBCMP) possessing  $\alpha$ -fibrinogenase and tissue haemorrhagic activity from venom of *Daboia russelli russelli*(Russell's viper): Evidence of distinct coagulant and haemorrhagic sites in RVBCMP. *Toxicon* 51, 923–933.

Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Sugihara, H., Tu, A.T., 1984. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox* (Western Diamondback Rattlesnake). *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 309–319.

Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567.

Prianti Jr., A.C.G., Robeiro, W., Lopes-Martins, R.A.B., Lira-da-Silva, R.M., Prado-Franceschi, J., Rodrigues-Simioni, L., cruz-Hofling, M.A., Leite, G.B., Hyslop, S., Cogo, J.C., 2003. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon* 41, 595–603.

Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araujo, H.S., 2006. Review: snake venom metalloproteinases structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Physiol. C* 142, 328–346.

Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Guerra-Sá, R., Rodrigues, V., Fontes, M.R.M., Giglio, J.R., 2000. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrinolytic metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 381, 213–224.

Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Andrião-Escarso, S.H., Franceschi, A.M., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., 2001. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie* 83, 471–479.

Rucavado, A., Núñez, J., Gutiérrez, J.M., 1998. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int. J. Exp. Pathol.* 79, 245–254.

Sanchez, E.F., Swenson, S., 2007. Proteases from South American snake venoms affecting fibrinolysis. *Curr Pharmaceut Anal* 3, 147–157.

Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinermer, P., Gomis-Ruth, F.X., McKay, D.B., Bode, W., 1995. The metzincins-topological and sequential relations

between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein. Sci.* 4, 823–840.

Stroka, A., Donato, J.L., Bon, C., Hyslop, S., Araujo, A.L., 2005. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus*(Fer-de-lance) snake venom. *Toxicon* 45, 411–420.

Suckau, D. Resemann, Schuerenberg, A., Schuerenberg, M., 2003. A novel MALDI LIFTTOF/ TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 376, 952–965.

Swenson, S., Markland Jr., F.S., 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* 45, 1021–1039.

Toombs, C.F., 2001. Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis. *Haemostasis* 31, 141–147.

Tu, A.T., Baker, B., Wongvibulsin, S., Willis, T., 1996. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. *Toxicon* 34, 1295–1300.

Wagstaff, S.C., Sanz, L., Juárez, P., Harrison, R.A., Calvete, J.J., 2009. Combined snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of the ocellated carpet viper, *Echis ocellatus*. *J Proteomics* 71, 609–623.

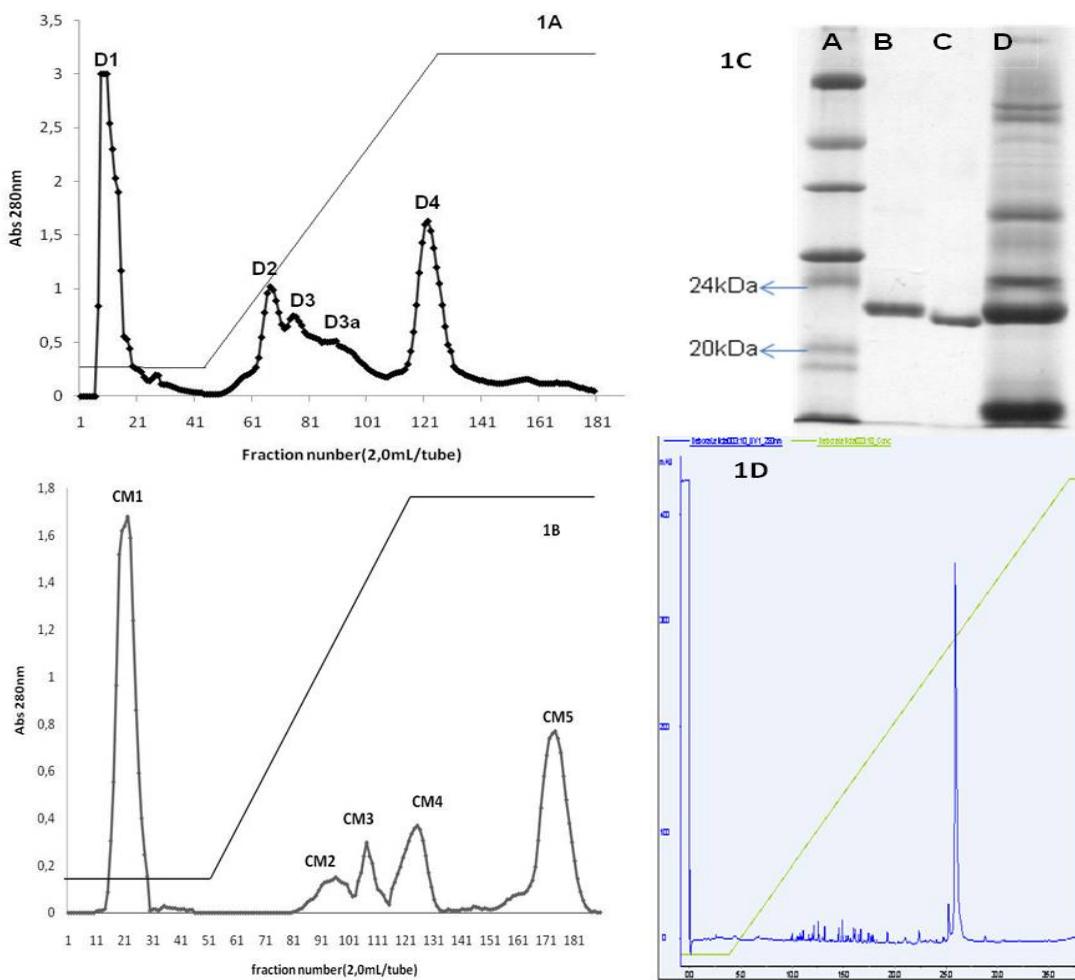
Watanabe, L., Shannon, J.D., Valente, R.H., Rucavado, A., Alape-Girón, A., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., Arni, R.K., 2003. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Sci.* 12, 2273–2281.

White, J., 2005. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* 45, 951–967.

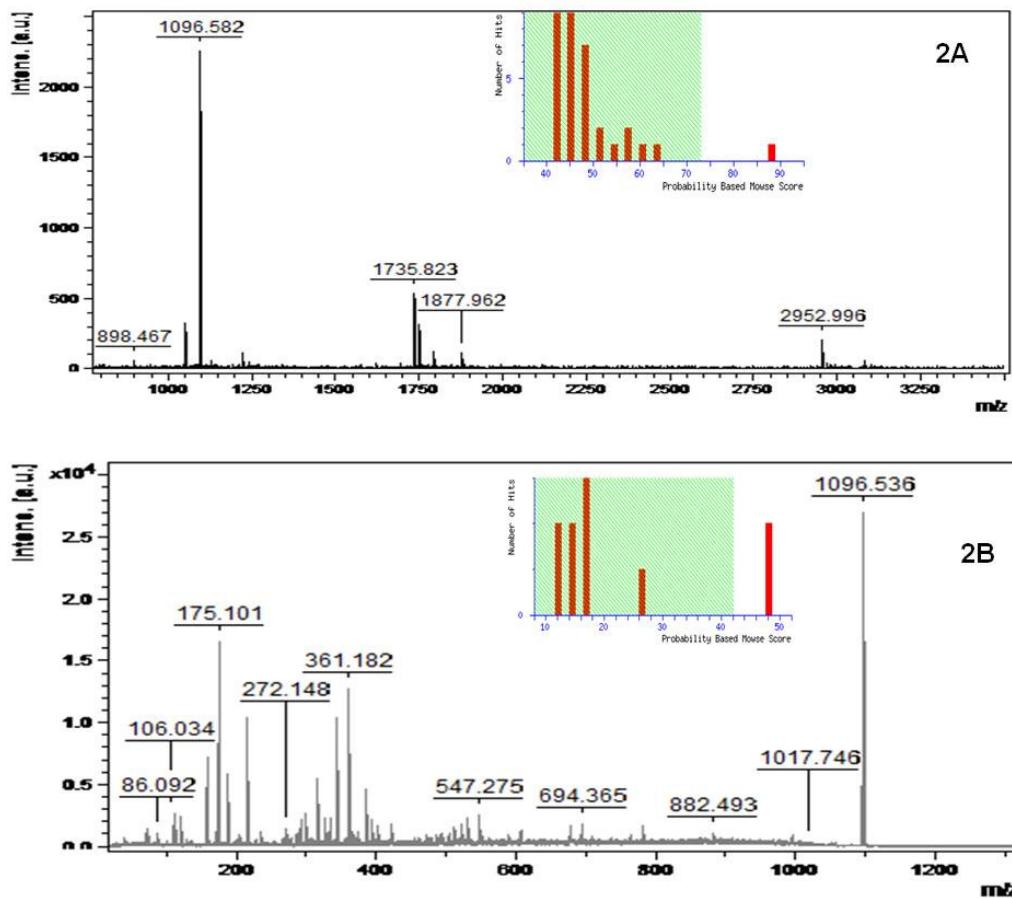
---

*figures for legends*

---



**Fig. 1.** Sequential purification steps of BleucMP: **(1A)** *Bothrops leucurus* venom (220 mg) on DEAE-Sephadex A-25, in 0.05 M ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8. A gradient was then applied up (from the fraction 40) to 0.5 M buffer and fractions of 2.0 mL/fraction were collected at a flow rate of 2.0 mL/h. **(1B)** D1 fraction was rechromatographed on CM-Sepharose fast flow and then eluted with the same conditions described above. The gradient (0.05–0.04 M) was then applied up from fraction 50. **(1 C)** SDS-PAGE (12%). Lanes: (A) molecular weight markers, (B) BleucMP under reducing conditions, and (C) BleucMP under non-reducing conditions; (D) *B. leucurus* crude venom. **(1D)** Analysis of BleucMP by RP-HPLC using a C2C18 column of 2.0×2.5 cm (GE Health Care), equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid and 5% acetonitrile) and eluted with a concentration gradient of solvent B (80% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) from 0 to 100% at a flow rate of 0.5 mL/min at room temperature.



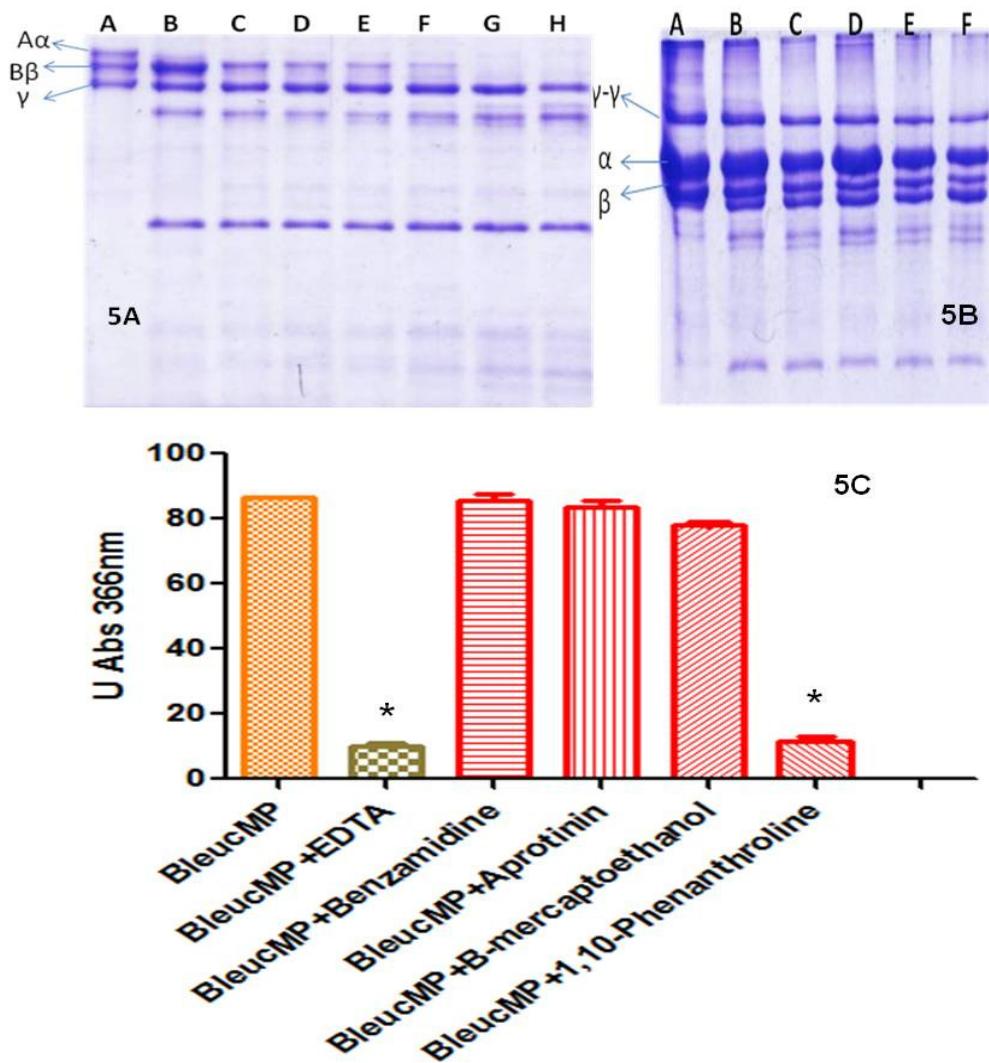
**Fig. 2.: (2A)** Spectrum of peptides (PMF: peptide mass fingerprinting) of BleucMP after enzyme digestion with trypsin in MALDI TOF/TOF. (Protein scores greater than 73 are significant  $p<0.05$ ). **(2B)** Fragmentation of the peak 1096.53 in MALDI TOF/TOF (MS/MS fragmentation); (individual ions scores  $>42$  indicate identity or extensive homology — $p<0.05$ ).

<b>Peptide 1</b>	<b>sequence YIELVVVADHGMFKK</b>	<b>observed MW 1748.93 Da</b>
<b>Peptide 2</b>	<b>sequence YNSNLNTIR</b>	<b>Observed MW 1094.51 Da</b>
<b>Peptide 3</b>	<b>sequence YNSNLNTIRK</b>	<b>observed MW 1222.74 Da</b>
<b>Peptide 4</b>	<b>sequence SMNVDAVLVNLEVWSK</b>	<b>observed MW 1791.87 Da</b>
<b>Peptide 5</b>	<b>sequence TLTSFGEWR</b>	<b>observed MW 1096.58 Da</b>
<b>Peptide 6</b>	<b>sequence ERDLLPR</b>	<b>observed MW 898.47 Da</b>

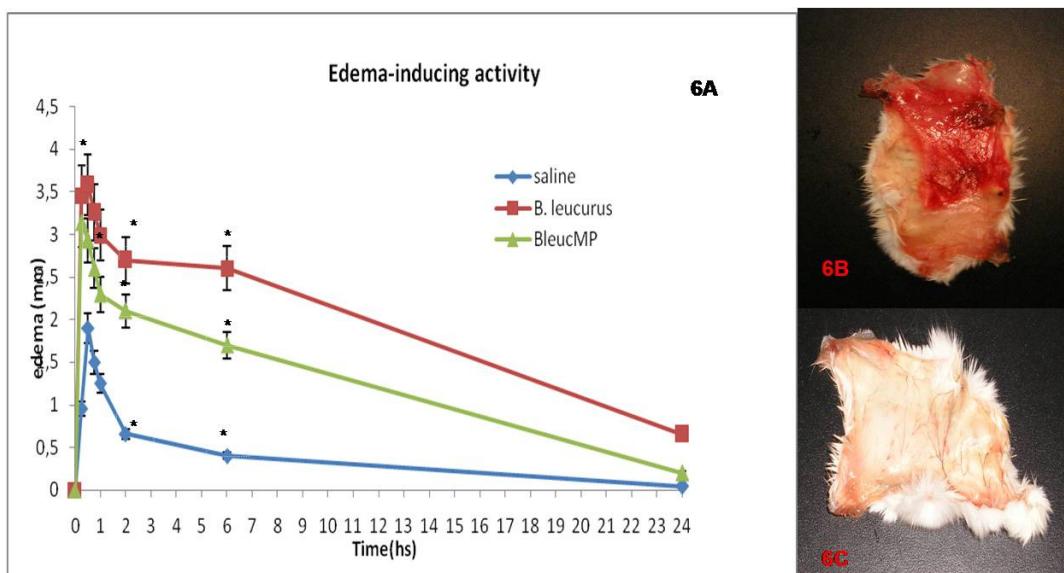
**Fig. 3.** The peptide mass fingerprinting with score of 88 (protein scores greater than 73 were considered significant —  $p<0.05$ ), 6 matched peptides and 29% of sequence coverage.

BleucMP	-----YIELVVVADHGMFKKYNNSNLNTIR-----
Leuc-A	-----SPRYIELVVVADHGMFKKYNNSNLNTIRKWVHEMLNTVNGFYRSMN
BnP2	-----YIELAVVADHGMFTKYNSNLNTIRKWVHEMLNTVNGFYRSMN
BmooMP $\alpha$ -I	-----EQQKFSPRYIELVVVADHGMFKKYNNSNLNTIRKWVHEMVNSMNGFYRSVD
BaP1	KKASQSNLTPEQQQRFSPRYIELAVVADRGIFTKYNSNLNTIRTRVHEMLNTVNGFYRSVD
Neuwiedase	-----QQRFFPQRYIELVIVADRRMYTKYNSDSNKIRTRVHELVNTVNGFFRSMN
Atroxase	-----EDQQNLSQRYIELVVVADHRVFMKYNSDLNIIRKRVHELVNTINGFYRSLN
	*****:****: : ****: * * .:: : :*::
BleucMP	VDASLVNLEVWS-----KTLTSFGEWRERDLLPR-----
Leuc-A	VDASLVNLEVWSKKDLIKVEKDSSKTLTSFGEWRERDLLPRISHDHAQLLTIVFLDEETI
BnP2	VDASIANIEWVS-----KTITSFGEWRERDIIPR-----
BmooMP $\alpha$ -I	VTASLANLEVWSKKDLINVQKDSRETLKSFGEWRERDLLPRISHDNAQLLTAIVFDGHTI
BaP1	VHAPLANLEVWSKQDLIKVQKDSSKTLKSFGGEWRERDLLPRISHDHAQLLTAVVFDGNTI
Neuwiedase	VDASLANLEVWSKKDLIKVEKDSSKTLTSFGEWRERDLLRRKSHDNAQLLTAIDFNGNTI
Atroxase	IDVSLTDLEIWSDQDFITVDSSAKNTLNSFGEWREADLRRKSHDHAQLLTAINFEGKII
	: . . . : : * : * : . . . * : * : *

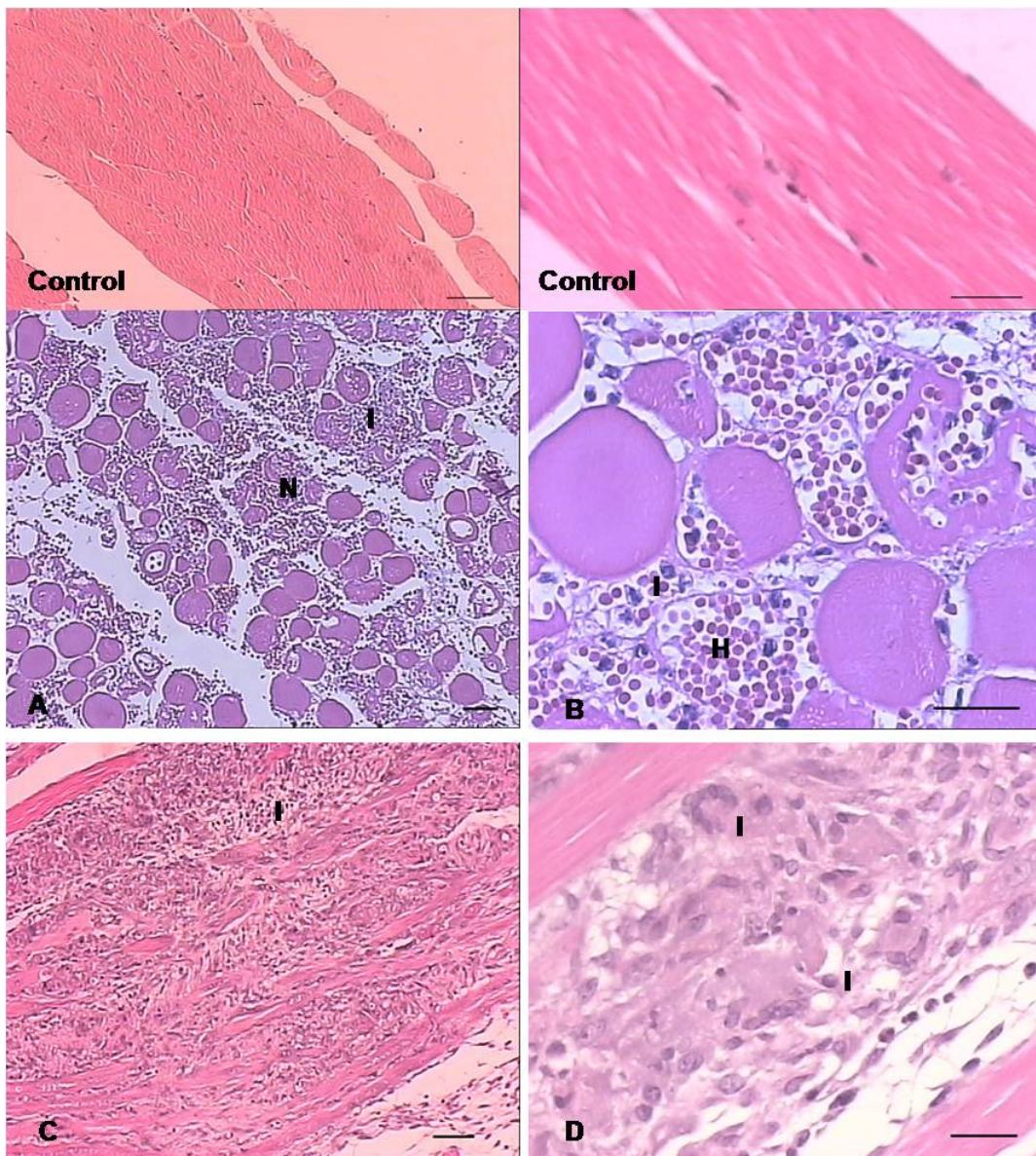
**Fig. 4.** Comparison of the amino acid sequence of BleucMP with other metalloproteinases. Alignment of peptide fragments generated by PMF of BleucMP with Leuc-a/*Bothrops leucurus* (Bello et al., 2006), BnP2/*Bothrops neuwiedi* (Baldo et al., 2008), BmooMP $\alpha$ -I/*Bothrops moojeni* (Bernardes et al., 2008), BaP1/*Bothrops asper* (Watanabe et al., 2003), Neuwiedase/*Bothrops neuwiedi* (Rodrigues et al., 2000), Atroxase/*Crotalus atrox* (Tu et al., 1996).



**Fig. 5.** Proteolytic activity of BleucMP upon, fibrinogen, fibrin and azocasein: **(5A)** SDS-PAGE at 12% of bovine fibrinogen degradation. Samples of 50  $\mu$ L fibrinogen (1.5 mg/mL) were incubated with Bleuc MP (5  $\mu$ g) at different intervals of time, Lane A: Fibrinogen control, Lanes B–H: Fibrinogen incubated with BleucMP by 1, 5, 10, 15, 30, 60 and 120 min, respectively. **(5B)** SDS-PAGE to 12% of fibrin degradation products at different intervals of time, Lane A: Fibrin control; B–F: Fibrin incubated with BleucMP (5  $\mu$ g) by 15, 30, 45, 60 and 120 min, respectively. **(5 C)** Azocaseinolytic activity determined by Abs 366 nm, with 10  $\mu$ g of BleucMP with and without the inhibitors (all inhibitors at concentration of 20 mM), One unit of azocaseinolytic activity was defined as the amount of enzyme which could produce an increase in absorbance (A366 nm) of 0.01 units/min. \*Difference significant in relation to BleucMP ( $n=3$ ) ( $P<0.005$  Student's t-test\*).



**Fig. 6.** (6A) Time-course of edema development in the mouse foot pad model after injection subplantar of 10 µg and 50 µg crude venom or BleucMP/25 µL saline, respectively. Edema was assessed by determining the foot pad thickness with the aid of a low pressure spring caliper and expressed as percentage increment in thickness. Results are presented as mean±S.D. (n=3). (6B) Hemorrhagic activity induced by 10 µg of *Bothrops leucurus* crude venom. (6C) Hemorrhagic activity induced by 50 µg of BleucMP. Statistical significance relative to control saline (n=5) ( $P<0.005$  Student's t-test\*).



**Fig. 7.** Light micrographs of sections of mouse gastrocnemius muscle 24 h after i.m. injection of 10 µg and 50 µg crude venom or BleucMP/50 µL saline, respectively, stained with hematoxylin-eosin. (7) Saline alone: normal integer fibers are seen; (**7A and 7B**) B. leucurus crude venom: notice the presence of a drastic myonecrosis, inflammatory infiltrate, hemorrhage and extensive cell destruction; (**7C and 7D**) BleucMP: Notice low inflammatory infiltrate (polymorphonuclear and mononuclear cells) and no hemorrhage under these conditions. Letters indicate the presence of necrosis (N), inflammatory infiltrate (I), and hemorrhage (H). Scale bar=100 µm (A and C); Scale bar=50 µm (B and D).

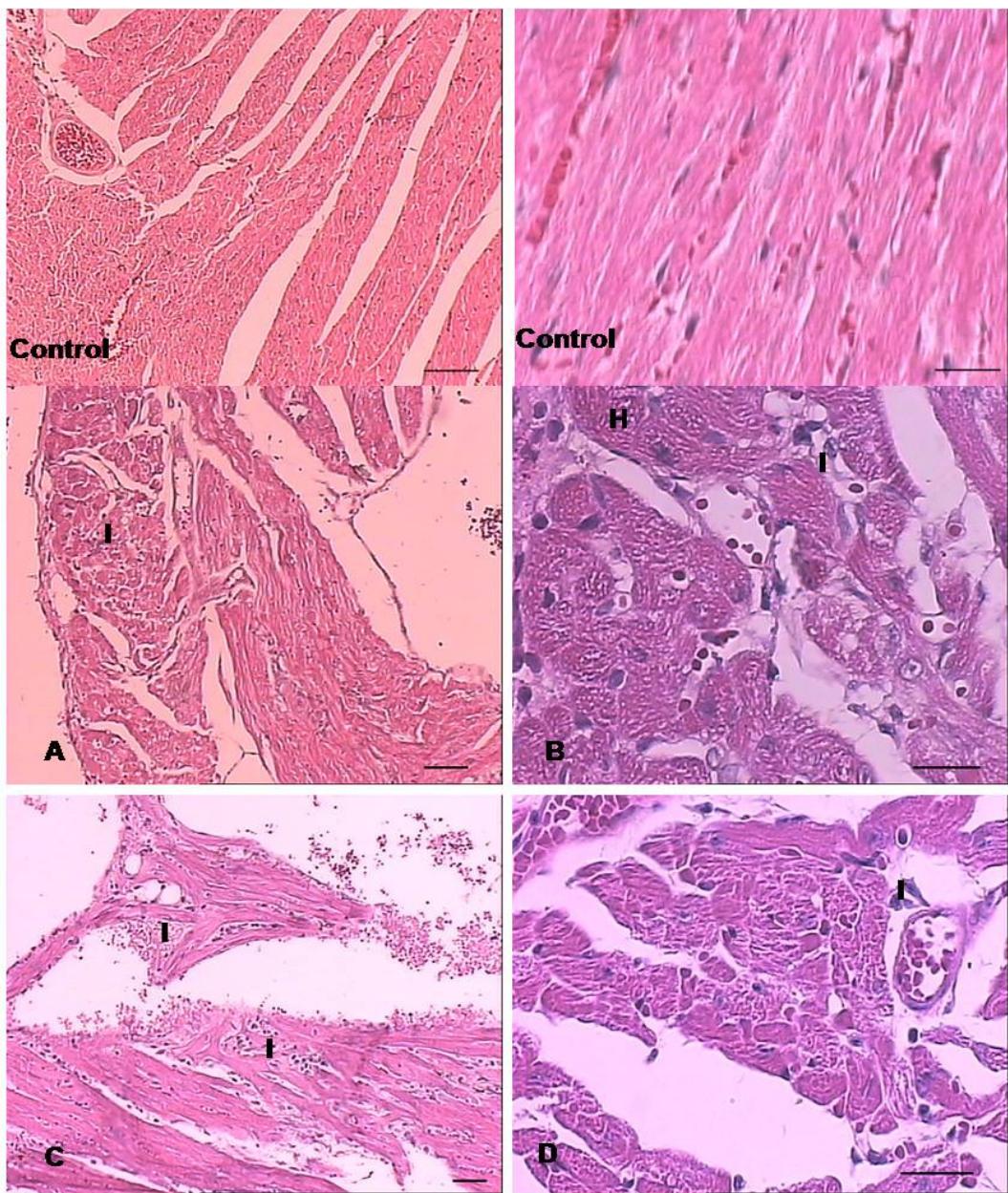
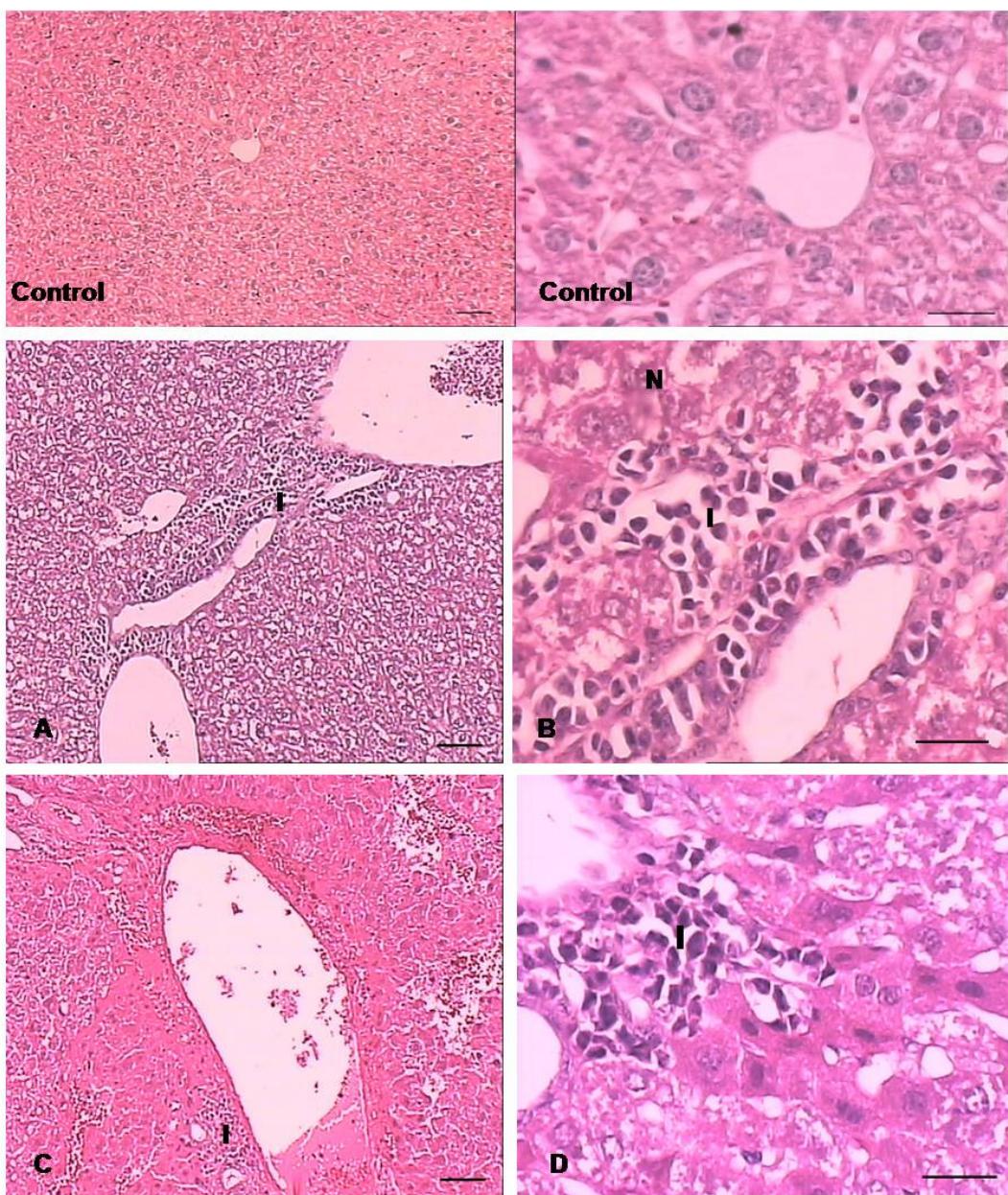
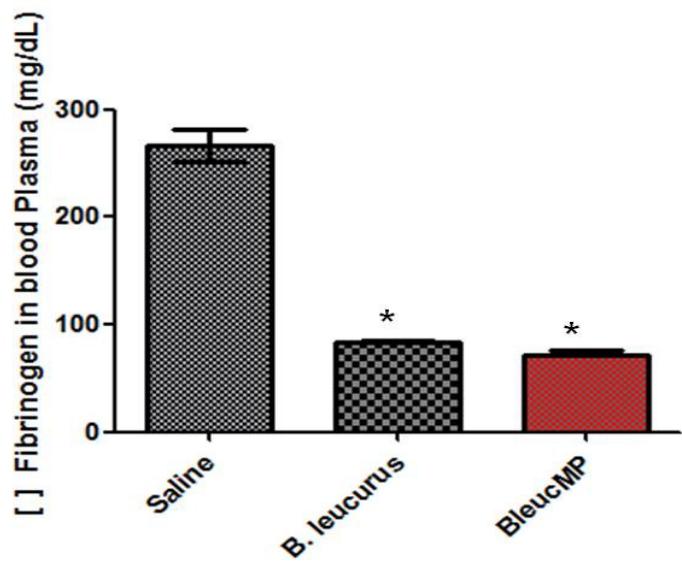


Fig. 8. Lightmicrographs of section of mouse cardiac tissues 24 h after i.p. injection of 10 µg and 50 µg crude venom or BleucMP/50 µL saline, respectively, stained with hematoxylin-eosin. (8) Saline alone: normal integerfibers are seen saline. (8Aand 8B): cardiac tissues: B. leucurus crude venomnotices the presence of intense inflammatory infiltrate and hemorrhage (8C and 8D) BleucMP: note low inflammatory infiltrate. Scale bar=100 µm (A and C); Scale bar=50 µm (B and D).



**Fig. 9.** Light micrographs of section of hepatic tissue 24 h after i.p. injection of 10 µg and 50 µg crude venom or BleucMP/50 µL saline, respectively, stained with hematoxylin-eosin. (9) Saline alone: normal integer fibers are seen saline. **(9A and 9B)**: hepatic tissue: *B. leucurus* crude venom notice intense inflammatory infiltrate (I) and necrosis (N). **(9C and 9D)** BleucMP: note shows low inflammatory infiltrate. Scale bar=100 µm (A and C); Scale bar=50 µm (B and D).



**Fig. 10.** Plasma fibrinogen determination after i.p. injections of crude venom or BleucMP (10 and 50 µg/50 µL saline) respectively. Control animals received only saline. The plasmatic fibrinogen concentration was determinate by Hemostat Fibrinogen Commercial kit. Bars represent the mean±SD (n=3). Statistical significance relative to control saline ( $P<0.005$  Student's t-test\*).

