



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

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA NOVA
“THROMBIN-LIKE” ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothrops pauloensis***

Fábio Lucas Silva Costa

Orientador: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-Orientador: Profa. Dra. Maria Inês Homs-Brandeburgo

Uberlândia
Janeiro - 2008

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

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA NOVA
“THROMBIN-LIKE” ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothrops pauloensis***

Fábio Lucas Silva Costa

Orientador: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-Orientador: Profa. Dra. Maria Inês Homs-Brandeburgo

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica).

Uberlândia - MG

Janeiro – 2008

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

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA NOVA
“THROMBIN-LIKE” ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothrops pauloensis***

ALUNO: Fábio Lucas Silva Costa

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: _____

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores : _____

Data da Defesa: ____/____/____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação foram contempladas

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

*“... Não devemos servir de exemplo a
ninguém. Mas podemos servir de lição.”*

(Mário de Andrade)

Agradecimentos

A Deus, o grande responsável por eu estar aqui hoje.

À professora Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela orientação criteriosa e atenciosa durante todas as fases de desenvolvimento desse projeto.

À professora Dra Maria Inês Homs-Brandeburgo que contribuiu imensamente com o conhecimento da Bioquímica durante os meus estudos. Diferenças individuais entre nós existiram, mas é inegável relatar o quanto a nossa convivência me enriqueceu. Muito obrigado por todas as oportunidades.

À professora Dra Amélia Hamaguchi pela confiança depositada em mim para trabalhar no laboratório e muitas vezes tirar dúvidas.

Aos professores Drs Andreimar M. Soares e André L. Fuly pela oportunidade em conhecer outros centros de pesquisa e enriquecerem meu trabalho.

À minha família a quem não poderei jamais deixar de agradecer, pela presença e apoio, sempre que precisei.

Ao meu amigo Luís Henrique, que me apoiou em momentos complicados e que com certeza contribuiu para que eu concluísse o mestrado neste laboratório. Muito obrigado.

Aos colegas do laboratório: Renata, Luís Fernando, Luís Carlos, Johara, Jordano, Letícia, Malson, Sâmela, Leonardo, Mirian, Débora, Francis, Dayane, Beto e Carolina, que de uma forma ou outra contribuíram para esse trabalho.

À Luciana pelo excelente convívio e pelas nossas conversas diárias.

Não posso também deixar esquecidas as pessoas que contribuíram de uma maneira ou de outra, para minha realização como pessoa e amigo, dando-me força e coragem. Aos meus amigos, André e Dani, Aninha, Paula, Alexandre (bonder), Luísa, Léo e Eduardo (bambam).

À minha querida amiga Clarissa, pela amizade e ótima recepção na sua casa durante as semanas que estive em Ribeirão Preto.

Aos funcionários do instituto de genética e bioquímica: Marlene, Tianinha, D. Nenzinha, Cleuber, Sr. Vilmar, D. Rosa e Gerson.

Ao Instituto Valée em fornecer os camundongos para realização dos experimentos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) e UFU (Universidade Federal de Uberlândia).

Sumário

Capítulo 1

Apresentação	1
1. 1- Introdução geral	4
1. 1. 1- Biologia das serpentes	4
1. 1. 2- Epidemiologia dos acidentes ofídicos	6
1. 1. 3- Peçonhas ofídicas: síntese, composição e variabilidade	8
1. 1. 4- O processo hemostático	10
1. 1. 5- Influência de componentes de peçonhas ofídicas sobre a hemostasia	15
1. 1. 6- Serinoproteases de peçonhas ofídicas (SVSPs)	19
1. 1. 7- Serinoproteases de peçonhas ofídicas com ação similar à trombina (SVTLEs)	21
1. 1. 8- Aplicações terapêuticas de SVTLEs na hemostasia	24
1.2- Referências bibliográficas	28

Capítulo 2

2. 1- Introdução	41
2. 2 – Materiais	43
2. 3 - Métodos	44
2. 3. 1- Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i> e obtenção da “thrombin-like TI-Bp”	44
2. 3. 2- Determinação quantitativa de proteínas	46
2. 3. 3- Caracterização Química	46
2. 3. 3. 1- Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes	46
2. 3. 3. 2- Focalização isoeétrica	47

2. 3. 3. 3- Seqüência N-terminal	48
2. 3. 4- Caracterização Enzimática	49
2. 3. 4. 1- Atividade coagulante	49
2. 3. 4. 2- Atividade fibrinogenolítica	50
2. 3. 4. 3- Atividade caseinolítica	50
2. 3. 4. 4- Atividade esterásica sobre o TAME	51
2. 3. 4. 5- Determinação da atividade procoagulante	51
2. 3. 4. 6- Determinação da função carboidrato na atividade coagulante da TI-Bp	52
2. 3. 4. 7- Teste de degradação da fibrina	52
2. 3. 4. 8- Teste de Agregação plaquetária	53
2. 3. 5- Atividades Biológicas	54
2. 3. 5. 1- Atividade edematogênica	54
2. 3. 5. 2- Análise miotóxica por dosagem de creatina cinase no plasma	54
2. 3. 5. 3- Atividade hemorrágica	55
2. 3. 5. 4- Ensaio de incoagulabilidade sanguínea	55
2. 3. 6- Análise Estatística	56
2. 4- Resultados	56
2. 4. 1- Isolamento e caracterização química	56
2. 4. 2- Características funcionais	57
2. 5- Discussão e Conclusões	60
2. 6- Referências bibliográficas	64

Lista de figuras

Capítulo 1

1- Representação das Subordens das Serpentes (Ofídios)	4
2- Epidemiologia de acidentes ofídicos provocados pela subfamília Crotalinae, na região do Triângulo Mineiro (MG) e áreas adjacentes	8
3- Cascata de coagulação e formação de fibrina pelas vias intrínseca e extrínseca	12
4- Comparação da via catalítica da trombina e SVTLEs sobre o fibrinogênio	22

Capítulo 2

1- Passos da purificação seqüencial da TI-Bp	75
2- Atividades coagulantes sobre o plasma bovino citratado	76
3- Atividades fibrinogenolíticas em PAGE-SDS	77
4- Atividade caseinolítica em PAGE-SDS	78
5- Determinação da atividade proteolítica da TI-Bp sobre diferentes substratos cromogênicos	79
6- Determinação da função carboidrato na atividade coagulante da TI-Bp	80
7- Concentração-dependente da agregação plaquetária induzida por TI- Bp.	81

Lista de tabelas

I - Rendimento protéico e atividade específica da purificação da TI-Bp isolada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>	70
II - Homologia da seqüência N-terminal entre a TI-Bp e outras enzimas thrombin-like	71

Lista de Abreviaturas

TI-Bp	Thrombin-like de <i>Bothrops pauloensis</i>
DMC	Dose Mínima Coagulante
SVSPs	Snake Venom Serineproteinases
SVTLEs	Snake Venom Thrombin-like Enzymes
PNGase F	N-glicosidase F
AMBIC	tampão bicarbonato de amônio
Bis-acrilamida	N,N' metileno-bis-acrilamida
CM	grupo carboximetil
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoreto
SDS	dodecil sulfato de sódio
TAME	N-p-tolueno-sulfonil arginina metil éster
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
TRIS	tris hidroximetilaminometano
TEMED	N, N, N', N'- tetrametil etilenodiamina
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PM	Peso Molecular
HPLC-RP	High Performance Liquid Cromatography
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
SBH	Sociedade Brasileira de Herpetologia
OMS	Organização Mundial de Saúde
Abs	absorbância

Apresentação

As serpentes peçonhentas sempre foram vistas de maneira totalmente destrutiva por muitas comunidades, no entanto elas são de fundamental importância no controle de diversas pragas que afetam a vida do homem. Os envenenamentos ofídicos constituem um problema de saúde pública no Brasil devido a grande incidência e à gravidade dos efeitos. O quadro clínico desenvolvido por um acidentado pode ser muito variado, dependendo da quantidade de peçonha que foi inoculada, da localização da picada, da idade e espécie da serpente e principalmente do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico. As peçonhas de serpentes de uma forma geral são constituídas por uma grande variedade de proteínas com efeitos tóxicos que podem atuar de forma isolada ou sinérgica potencializando ainda mais os danos teciduais locais ou sistêmicos.

O interesse pelo estudo das características químicas e funcionais de toxinas isoladas de peçonhas ofídicas não é devido somente à sua relevância no envenenamento, mas também pela sua possível utilização como valiosos instrumentos de pesquisa em outras áreas do conhecimento. Estudos farmacológicos e bioquímicos das peçonhas de serpentes, realizados nas últimas três ou quatro décadas, têm mostrado a riqueza de enzimas, toxinas, compostos biologicamente ativos, e a grande diversidade de suas ações. Conseqüentemente, numerosas tentativas vêm sendo realizadas para utilizar esses compostos como ferramentas para pesquisas na área médica.

As alterações da coagulação sangüínea, causadas por peçonhas ofídicas, também têm sido alvo de muitas pesquisas desde a década de 60 no Brasil. Enzimas coagulantes, conhecidas como “thrombin-like” são importantes na compreensão dos processos complexos envolvidos na coagulação do sangue. São utilizadas também como auxiliares nos diagnósticos clínicos, além de agentes terapêuticos para provocar a desfibrinogenação no tratamento de desordens trombóticas.

Neste trabalho procuramos formas simples e eficientes de isolar a primeira enzima “thrombin-like” da peçonha de *Bothrops pauloensis*, assim como caracterizá-la química e funcionalmente. Esses estudos nos permitem compreender os diversos mecanismos de ação desta classe de enzimas, que possivelmente abrem perspectivas para uma possível utilização futura desta proteína como modelo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos.

A apresentação deste trabalho foi realizada seguindo as normas do curso de Pós- Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia-MG e da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT, sendo dividido em dois capítulos. O **Capítulo 1** - Introdução Geral ou revisão bibliográfica da literatura envolvendo aspectos gerais sobre o envenenamento ofídico, composição e diversidade de suas peçonhas e alterações do sistema de coagulação sanguínea, enfatizando principalmente as enzimas “thrombin-like”. O **Capítulo 2** - apresenta um artigo intitulado: Caracterização bioquímica e funcional de uma nova “*thrombin-like*” isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* (artigo em preparação).

Capítulo 1

1. 1 Introdução Geral

1. 1. 1- Biologia das Serpentes

As serpentes pertencem a um grupo extraordinário de vertebrados terrestres, com numerosas especializações que as diferenciam de outros esquamados, como lagartos e anfisbenas. O sistema músculoesquelético permite as serpentes possuírem hábitos rastejantes, fossoriais, natatórios e até mesmo capacidade de realizar planagem (COATES; RUTA, 2000).

As serpentes modernas são divididas em três superfamílias, a Scolecophidia (Typhlopoidea), a Henophidia (Boidea) e a Caenophidia (Xenophidia), (Figura 1).

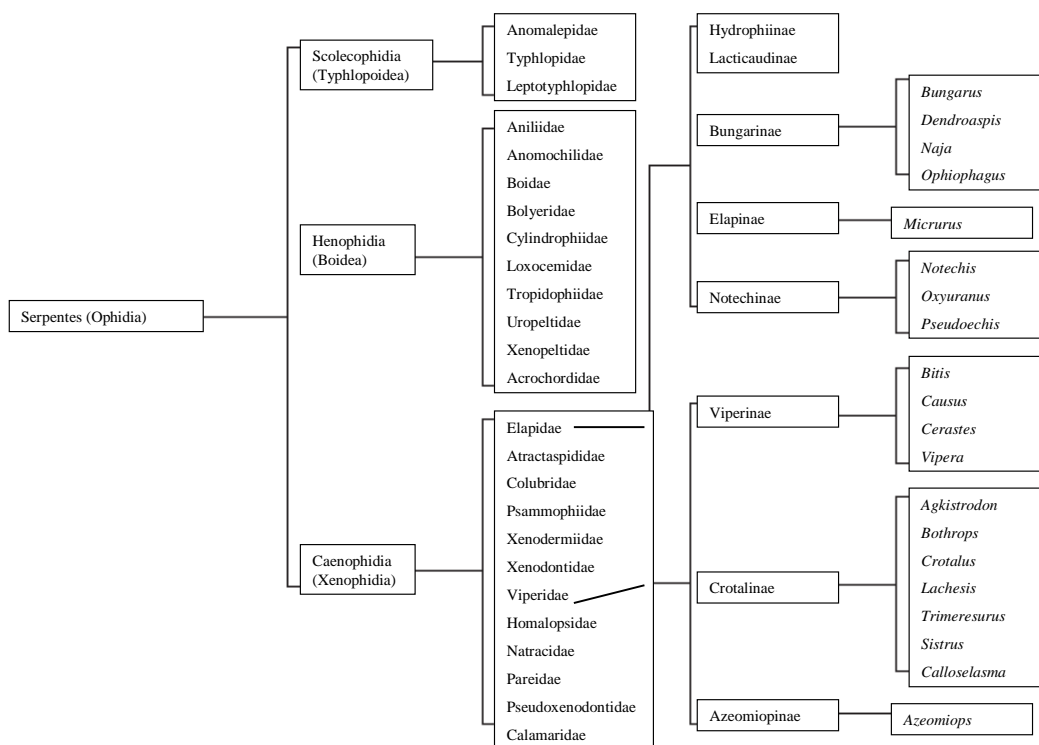


Figura 1: Representação das Subordens das Serpentes (Ofídios), (GRAHAM et al., 2007).

A superfamília Scolecophidia é representada por serpentes fossoriais com características primitivas como a presença de vestígios pélvicos. A superfamília Henophidia contém muitas famílias que mostram uma transição de formas primitivas, como a família Aniliidae, a qual possui vestígios pélvicos e formas derivadas como a família Achrochordidae que são mais similares aos caenofídios. Por fim, as serpentes mais desenvolvidas e especializadas são representadas pela superfamília Caenophidia, as quais incluem dentre outras, as famílias Colubridae, Elapidae e Viperidae (GRAHAM et al., 2007).

Atualmente são listadas no país cerca de 353 espécies de serpentes distribuídas em 9 famílias em que quatro delas têm maior importância epidemiológica em território nacional, a Colubridae (262 espécies), a Boidae (9 espécies) e sendo as espécies peçonhentas representadas pelas famílias Elapidae (27 espécies) e Viperidae (27 espécies), (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, SBH, 2007).

A família Viperidae responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Brasil, é constituída pelos gêneros: *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*, todos representantes da subfamília Crotalinae.

Serpentes botrópicas possuem cauda lisa, não possuem chocalho e as suas cores variam muito, dependendo da espécie e da região onde vivem. São popularmente conhecidas como jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, patrona, combóia, caiçaca e diversas outras denominações. Habitam zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha), (CARDOSO, 2003). Tem hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares e podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes a partir de postura corpórea enrodilhada sem produzir ruído (ARAÚJO; MARTINS, 2007). Particularmente, em regiões rurais e tropicais, picadas por elas causam morbidez e mortalidade nas vítimas (WHITE, 2005).

O gênero *Bothrops* compreende 25 espécies, distribuídas em todo território nacional. As espécies mais conhecidas são: *Bothrops atrox*, encontradas no Norte do

Brasil, *Bothrops erythromelas*, na região Nordeste, *Bothrops jararaca*, na região Sul e Sudeste, *Bothrops jararacussu*, no Cerrado da região Central e em florestas tropicais do Sudeste, *Bothrops alternatus*, distribuídas ao Sul do país e o complexo *Bothrops neuwiedi*, encontradas em todo território nacional, exceto na Bacia Amazônica (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, FUNASA, 2001).

Bothrops pauloensis foi descrita por Amaral em 1925 como *Bothrops neuwiedi pauloensis*, constituindo uma das doze subespécies de *Bothrops neuwiedi*. Recentemente, com a revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* realizado por Silva (2000) e baseando em análises de caracteres morfológicos múltiplos, as doze subespécies passaram a ser consideradas sete espécies distintas, proposta esta aceita pela SBH em 2005.

Bothrops pauloensis é listada principalmente no Brasil e outros países vizinhos sul-americanos, como a Bolívia (JANSEN, 2006). No Brasil tem sido registrada em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (SILVA, 2000). Preferem habitar ambientes do Cerrado brasileiro, seja *sensu stricto*, campo cerrado, campo sujo ou campo limpo, nas zonas geográficas do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, inclusive em áreas alteradas pelo processo de urbanização (BRITES et al., 1988).

1. 1. 2- Epidemiologia dos acidentes ofídicos

Os acidentes por animais peçonhentos acarretam sérios problemas à saúde humana e por isso, deveriam ser obrigatoriamente notificados ao Ministério e às Secretarias Estaduais de saúde (BOCHNER; STRUCHINER, 2002).

Existem no mundo aproximadamente 3000 espécies de serpentes, das quais de 10 a 14% são consideradas peçonhentas. A OMS (Organização Mundial de Saúde) calcula que ocorram anualmente no mundo 1.250.000 a 1.665.000 acidentes por serpentes peçonhentas, com 30.000 a 40.000 mil mortes. A mortalidade dos acidentados varia nas diferentes regiões do mundo.

Na Ásia, principalmente na Índia, Paquistão e Birmânia, os acidentes ofídicos provocam de 25.000 a 35.000 mil óbitos por ano, sendo umas das serpentes mais importantes a *Vipera russeli*. Na Nigéria, ocorrem 500 casos por 100.000 mil habitantes, com taxa de mortalidade de 10%. Nos Estados Unidos, 12 a 15 dos 8.000 casos anuais são fatais, com mortalidade de 0,2%. Na África, ocorrem de 400 a 1000 mortes por ano, causadas principalmente pelas serpentes conhecidas como naja (PINHO; PEREIRA, 2001).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, ocorrem entre 19.000 a 22.000 mil acidentes ofídicos por ano, com média de aproximadamente 13,5 acidentes para cada 100.000 habitantes. Os dados da FUNASA, 2001, mostraram a distribuição dos acidentes ofídicos no período de 1990 a 1993 e revelaram que, 90,5% das notificações de acidentes foram referentes ao gênero *Bothrops*, 7,7% a *Crotalus*, 1,4% a *Lachesis*, todos membros da família Viperidae, e somente 0,4% ao gênero *Micrurus*, pertencente à família Elapidae. A letalidade geral foi de 0,45% e mais significativa nos acidentes crotálicos (1,87%).

Na região central do Brasil, especialmente no Triângulo Mineiro, dados epidemiológicos advindos do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da cidade de Uberlândia revelaram a ocorrência de 90 casos de acidentes por serpentes da subfamília Crotalinae no período de 1993 a 1995. Do total de acidentes ofídicos, 68 foram causados pelo gênero *Bothrops*, 22 pelo gênero *Crotalus*, e somente, 2 pelo gênero *Micrurus* (DA SILVA et al., 2003).

A epidemiologia dos acidentes ofídicos aponta para um perfil que se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos no Brasil. Estes acidentes ocorrem com maior frequência no período de setembro a março e com o aumento da atividade humana no campo. Pessoas do sexo masculino, principalmente trabalhadores rurais, na faixa etária produtiva de 15 a 49 anos são preferencialmente acometidos (Figura 2), (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).



Figura 2: Epidemiologia de acidentes ofídicos provocados pela subfamília Crotalinae, na região do Triângulo Mineiro (MG) e áreas adjacentes, (DA SILVA et al., 2003).

1. 1. 3- Peçonhas ofídicas: Síntese, composição e variabilidade

As serpentes do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* possuem dentes inoculadores bem desenvolvidos e fosseta loreal, um orifício situado entre o olho e a narina, um órgão sensorial com função de termorrecepção, o qual indica com segurança que a serpente é peçonhenta. As serpentes do gênero *Micrurus* são uma exceção, pois, apesar de serem peçonhentas, não apresentam fosseta loreal e possuem dentes inoculadores pouco desenvolvidos (CARDOSO, 2003).

As serpentes peçonhentas, para se defenderem possuem glândulas exócrinas modificadas, que sintetizam, armazenam e secretam toxinas, as quais são formadas por complexas misturas de 50-60 proteínas ou peptídeos de diferentes estruturas e com uma ampla variedade de atividades biológicas (MATSUI et al., 2000).

Os mecanismos celulares que regulam a produção e secreção de proteínas nesse órgão são desconhecidos. Sabe-se que a produção da peçonha depende dos níveis protéicos armazenados no lúmen glandular. Como a proporção de grânulos secretores nas células glandulares representa apenas 4% do volume celular, acredita-se que a secreção de toxinas ocorre continuamente após a síntese (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002).

Além disso, é importante ressaltar que a quantidade de peçonha inoculada varia de acordo com o porte da serpente e também, se ela atacou outra presa recentemente. No caso de serpente do gênero botrópico, há uma diferença entre a peçonha do filhote, que é predominantemente coagulante, e do adulto, com maior ação proteolítica e menor ação coagulante (OLIVEIRA et al., 2003).

As peçonhas, que originalmente eram substâncias digestivas, foram acrescidas de novos componentes, como peptídeos farmacologicamente ativos e enzimas indutoras de uma variedade imensa de efeitos, além de toxinas não-enzimáticas e uma porção não-proteica representada por cátions metálicos, citratos, carboidratos, nucleosídeos, aminas, aminoácidos livres e lipídeos (MARKLAND, 1998). Tais substâncias na peçonha tornam uma importante ferramenta para a serpente, não só para a apreensão e digestão do alimento, como também para a defesa.

As enzimas proteolíticas podem apresentar ação nos constituintes da própria peçonha. De fato, algumas proteínas são derivadas de grandes precursores que são quebrados durante a formação da peçonha. Esta atividade proteolítica endógena aumenta a variabilidade das toxinas fazendo assim com que diferenças individuais em uma mesma espécie de serpente sejam observadas (SOUSA et al., 2000; SALAZAR et al., 2006). Em 1996, Daltry e col. publicaram um interessante trabalho, no qual descreveram que a presença de determinados componentes da peçonha de uma mesma espécie de serpente depende da variação geográfica em que estão submetidas, em associação com a dieta utilizada por elas.

Peçonhas ofídicas, portanto, possuem uma vasta variedade de componentes que são responsáveis por conduzirem alterações no sistema hemostático, além de

provocarem hemorragias freqüentes diagnosticadas após o envenenamento. Pesquisadores sugerem que esses processos são parte de uma estratégia que as serpentes utilizam para imobilizar as vítimas, no entanto, toxinas provavelmente também contribuem para aumentar a permeabilidade do tecido alvo para outros componentes da peçonha (MARSH; WILLIAMS, 2005).

1. 1. 4- O processo hemostático

Hemostasia é um delicado balanço entre o processo de formação de coágulo, o qual ocorre por ações coordenadas por uma série de sinais químicos mutuamente dependentes, até sua completa dissolução, a fibrinólise. Estes processos opostos são mantidos em equilíbrio pelas propriedades hemodinâmicas do sangue (BRAUD et al., 2000).

A coagulação ocorre em uma superfície vascular via ativação de uma cascata trombótica de algumas serinoproteases “trypsin-like” eventualmente conduzindo para formação de trombina e coágulo. Em pessoas saudáveis, esta cascata é firmemente regulada para prevenir perda de sangue, mas também para evitar formação de coágulos inapropriados (BODE, 2006).

Em condições fisiológicas, a coagulação inicia-se através de injúria na parede de um vaso, isto conduz uma vasoconstrição ou contração neurogênica local que altera a superfície endotelial vascular. Estas modificações no endotélio permitem a formação de um tampão plaquetário primitivo e liberação pelas células injuriadas de sinais químicos, os quais reversivelmente ativam trombócitos e sistema coagulante plasmático. Os ativadores químicos tais como ADP (Adenosina Difosfato), trombina, catecolaminas e colágeno são essenciais para os processos de adesão e agregação plaquetária (KORNALIK, 1985).

A adesão de plaquetas ocorre a princípio em superfícies carregadas negativamente que promovem interações entre glicoproteínas da membrana de plaquetas, principalmente glicoproteínas Ib (GPIb), VI (GPVI) e complexo Ia/integrina

Ila, com proteínas do subendotélio como fator de von Willebrand (vWF), colágeno, fibronectina e vitronectina.

Em seguida, a ativação de plaquetas requer mudanças estruturais e químicas rápidas que consistem na remodelagem celular do citoesqueleto para facilitar o espalhamento e a agregação, além de permitir alteração na forma plaquetária, a qual passa de discóide para esférica, irregular e com formação de pseudópodes. Nesta fase também ocorrem mudanças na composição da membrana plasmática e secreção de constituintes presentes nos grânulos alfa, corpos densos e lisossomais (HARTWING, J. H.; 2003; KROLL, M. H.; RESÉNDIZ, J. C.; 2003).

Os grânulos α contêm proteína neutralizadora de heparina (fator 4 plaquetário), β -tromboglobulina, proteínas básicas com intensa atividade mitogênica, conhecidas como fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), trombospondina e enzimas. Os corpos densos armazenam serotonina, potássio, ATP (Adenosina Trifosfato), ADP e cálcio. Por fim, os grânulos lisossomais, são outra fonte de enzimas, além de glicoproteínas e catecolaminas (KORNALIK, 1985; PEERSCHKE, E. I. B.; LÓPEZ, J. A.; 2003). Os microtubulos circunferenciais e os filamentos submembranas se contraem, comprimindo os diversos componentes dispersos no citosol. Com isso, esses elementos são espremidos e formam uma massa no centro da plaqueta acarretando a eliminação dessas diversas substâncias pelo sistema canalicular aberto (KORNALIK, 1985).

O processo de ativação plaquetária associado com a liberação de constituintes dispersos no citosol e mudanças na forma das plaquetas aumenta a área de superfície e facilita a aderência permitindo a formação de agregados, por estimular secundariamente outras plaquetas no sítio da injúria vascular e a agregação plaquetária continua via interações plaqueta-plaqueta e interações entre os sinalizadores químicos (KORNALIK, 1985; HARKER, 1997).

Entretanto, o tampão plaquetário não é uma estrutura estável e precisa ser reforçado por outros componentes sanguíneos. Assim, o processo de coagulação propriamente dito torna-se imprescindível na contenção eficiente do sangramento.

As primeiras teorias racionais que explicam a coagulação do sangue foram formuladas por Schmidt e Morawitz em 1892 e 1905, respectivamente. No entanto, elas foram modificadas entre as décadas de 1940 e 1960, pela descoberta de adicionais fatores coagulantes. Assim, o mecanismo de coagulação é mais bem explicado por Macfarlane (1964), Davie e Ratnoff (1964), (Figura 3).

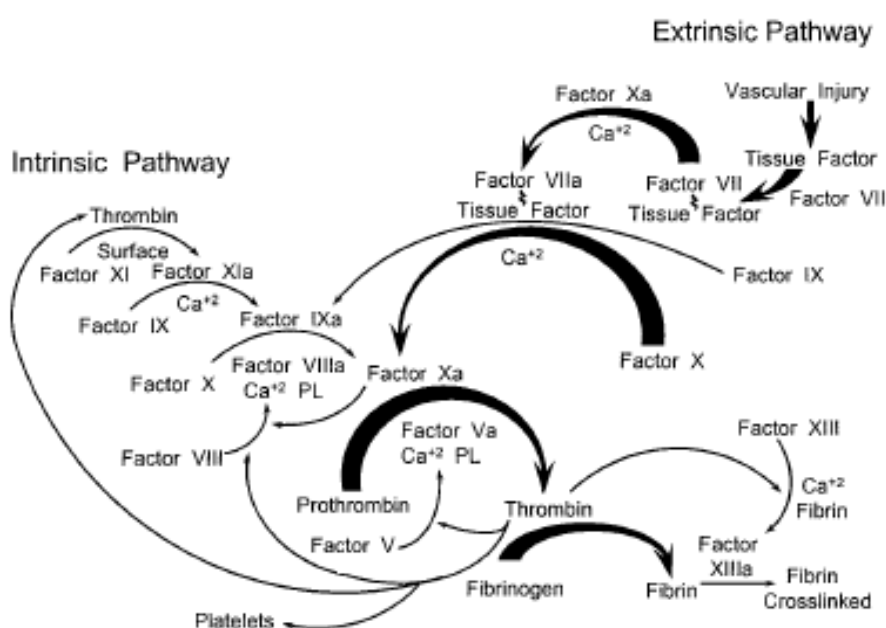


Figura 3: Cascata de coagulação e formação de fibrina pelas vias intrínseca e extrínseca (DAVIE, 2003).

A cascata de coagulação é considerada uma ativação seqüencial de zimogênios, ou seja, cada fator é substrato para a enzima anterior e ativador da proenzima subsequente. A maioria das etapas da coagulação está ligada à proteólise limitada e, quase todos os fatores são serinoproteases, com exceção do fator XIIIa, que é uma transpeptidase.

O processo de coagulação, didaticamente é separado em duas vias: intrínseca e extrínseca. Estas vias convergem para a ativação do fator X que culmina na formação do coágulo de fibrina (DAVIE, 2003).

A via intrínseca inicia com o processo conhecido como fase de contato que envolve fator XII, pré-callicreína, HMWK (cininogênio de alto peso molecular) e fator

XI. A fase de contato é independente de cálcio e fosfolipídios, mas uma superfície ativa carregada negativamente é o elemento desencadeador necessário para ativação e união dos fatores de contato. Inicialmente ocorre uma reação cíclica entre fator XII e pré-caliceína. Após contato com a superfície, o fator XII é clivado em duas cadeias transformando em sua forma ativa, fator XIIa. Este, converte pré-caliceína em caliceína e fator XI em fator XIa. Por sua vez, a caliceína catalisa geração própria por ativar o fator XII, acelerando a fase de contato. Outro acelerador é o HMWK, o qual, atua como molécula carreadora responsável por aumentar a concentração dos fatores de contato.

O fator XIa, ligado a cálcio e fosfolipídios é clivado para gerar fator IXa, o qual não tem atividade enzimática, mas é importante na última fase da via intrínseca, que é a formação do fator Xa. Os fatores coagulantes (IXa, X e VIII) formam um complexo multimolecular na presença de fosfolipídios e cálcio, que transformam a forma inativa do fator X em ativa (FXa).

A via extrínseca é ativada no momento da injúria. O fator VII se liga ao fator tecidual e forma um complexo na presença de fosfolipídios e cálcio, o qual facilita a conversão do fator VII na sua forma ativa, por clivagem de um peptídeo interno. Este complexo ativa o fator X ao clivar um peptídeo na cadeia pesada da molécula e além disto, ativa o fator IX por proteólise limitada.

Após a formação do fator Xa por ambas as vias, intrínseca e extrínseca, há amplificação do processo que leva a produção de trombina. Neste passo, o fator Xa ativa o fator V e forma um complexo em presença de cálcio e fosfolipídios chamado de complexo ativador protrombinase, o qual é responsável em converter protrombina em trombina (DAVIE, 2003).

Estudos de coagulação sanguínea utilizando modelos "*in vitro*" (BUTENAS; MANN, 2002) demonstraram que a iniciação da geração de trombina pelo fator tecidual, pode ser dividida em duas fases: Fase de iniciação e Fase de propagação. De acordo com esses autores, a fase de iniciação é caracterizada por geração de quantidades nanomolares de trombina e quantidades muito menores de fatores VIIa, IXa, Xa e XIa, e pela ativação parcial de plaquetas, bem como proteólise de procofatores. Subseqüentemente, em presença de todas as proteínas

procoagulantes com médias concentrações no plasma permitem o início da fase de propagação, em que ocorre a geração de trombina. As características da fase de propagação são: a conversão de protrombina em taxas elevadas, completa ativação de plaquetas e formação de coágulo sólido. Contudo, pesquisas recentes de modelos “*in vitro*” da coagulação sanguínea mostram acordo com resultados obtidos de observações “*in vivo*”, o que torna necessário uma mudança de paradigma ao tratar e estudar o processo do sistema de coagulação sanguínea.

A trombina resultante consiste de 36 resíduos de aminoácidos que formam a cadeia A e 256 resíduos na cadeia B, ligados covalentemente por pontes dissulfeto. A cadeia B é homóloga à tripsina e exibe propriedades procoagulantes importantes: ativação do fator VIII, V e XI, ativa ligações cruzadas na rede de fibrina pelo fator XIIIa e estimula a agregação plaquetária. Além disso, exerce um papel crítico na coagulação por iniciar a formação de fibrina, por converter o fibrinogênio solúvel em monômeros de fibrina (BODE, 2006; WOLBERG, 2007).

O fibrinogênio é uma molécula globular simetricamente dimérica. Cada unidade do dímero é composto de três cadeias designadas $A\alpha$, $B\beta$ e γ , detidas unidas por pontes dissulfeto (WOLBERG, 2007). A transformação do fibrinogênio solúvel em gel de fibrina procede em três passos: ação proteolítica, polimerização e estabilização (KORNALIK, 1985).

A trombina liga na região central do fibrinogênio e atua proteolicamente clivando ligações peptídicas arginina-glicina, removendo peptídeos N-terminais das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$. A princípio, a trombina cliva a cadeia $A\alpha$ para liberar um fibrinopeptídeo A (FpA) composto de 16 resíduos de aminoácidos e, subseqüentemente atua removendo 14 resíduos da cadeia $B\beta$, que formam os fibrinopeptídeos B (FpB). A molécula de fibrinogênio destituída destes fibrinopeptídeos é chamada de monômero de fibrina, fase conhecida como polimerização da rede de fibrina. No entanto, o coágulo necessita ser fortalecido e então, a trombina ativa uma transglutaminase, o fator XIII, que atua de forma altamente específica por introduzir ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina

para formar um coágulo insolúvel e resistente à proteólise (KORNALIK, 1985; WOLBERG, 2007).

A formação descontrolada de trombos no organismo poderia culminar em morte com obstrução acidental de veias ou artérias. Portanto, o coágulo deve ser dissolvido para liberar o fluxo sanguíneo e para isto, há vários mecanismos que regulam a hemostasia (BRAUD et al., 2000).

Em presença de trombomodulina, a trombina perde suas propriedades procoagulantes, adquirindo caráter anticoagulante e antifibrinolítico. A interação destas duas moléculas ativa a proteína C, que degrada os fatores Va e VIIIa para inativar o complexo protrombinase.

Muitas etapas do sistema hemostático são reguladas por vários inibidores específicos pertencentes a diferentes famílias de proteínas, embora a mais comum são as serpinas, família de serinoproteases com atividade inibitória. Alguns inibidores específicos atuam sobre determinados fatores coagulantes para impedir que o coágulo se espalhe em outras regiões e, outros, podem atuar no sistema fibrinolítico para inibir a fibrinólise se o processo de cicatrização do vaso ainda não estiver sido reparado (BODE, 2006).

O restabelecimento sanguíneo é propiciado principalmente pelo sistema fibrinolítico, evento responsável por dissolver gradualmente o coágulo. A atividade de dissolução é principalmente devido a serinoprotease plasmina, produzida por ativação do plasminogênio por potentes ativadores, o ativador de plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA), (SANCHEZ; SWENSON, 2007).

1. 1. 5- Influência de componentes de peçonhas ofídicas sobre a hemostasia

O sistema hemostático humano e de muitos outros mamíferos são alvos favoritos de peçonhas Viperidae. Suas toxinas atingem quase todas as partes do sistema, conduzindo mudanças espetaculares na hemostasia. Muitos desses componentes estimulam ou inibem o mecanismo hemostático, incluindo a cascata de

coagulação sanguínea, fibrinólise, hipotensão, integridade vascular e função plaquetária (MARKLAND, 1998).

Os principais componentes ativos que interferem na hemostasia podem ser agrupados como: 1) Procoagulantes: pertencem a este grupo, os ativadores de fatores V, X, IX e protrombina, além de proteases com ação similar à trombina, conhecidas como enzimas “thrombin-like”. 2) Anticoagulantes: ativador de proteína C, proteínas que ativam a formação do complexo fator IX/X, inibidores de trombina e fosfolipases A₂. 3) Fibrino(geno)líticas: proteínas que degradam fibrinogênio e ou fibrina e toxinas ativadoras de plasminogênio. 4) Proteínas que interagem com superfícies vasculares: as hemorraginas. 5) Atividade sobre plaquetas: incluem toxinas que induzem ou inibem a agregação plaquetária. 6) Ativadores de proteínas do plasma: pertencem ao grupo os inibidores, conhecidos como serpinas (WHITE, 2005).

Muitas dessas toxinas que interferem na hemostasia são enzimas, como as fosfolipases A₂, nucleotidases, fosfodiesterases, L-amino oxidases, metaloproteases e serinoproteases, enquanto outras, tais como desintegrinas e lectinas tipo-C, não possuem atividade enzimática (MARKLAND, 1998).

O efeito de algumas toxinas ofídicas no processo hemostático em alguns casos é bem claro. Por exemplo, nucleotidases, hidrolizam ADP que inibem a agregação plaquetária. Algumas fosfolipases A₂ de peçonhas ofídicas atuam como anticoagulantes por hidrolisarem de forma eficiente superfícies de fosfolipídios carregados negativamente. Já outras fosfolipases A₂ hidrolizam fosfolipídios de membranas plaquetárias e induzem agregação por liberar ácido araquidônico e/ou fatores agregantes (KINI; EVANS; 1989). Portanto, em contraste às enzimas fosfolipases A₂ de mamíferos, muitas enzimas fosfolipases A₂ isoladas de peçonhas ofídicas, apesar de apresentarem estruturas comuns exibem funções múltiplas, elas são tóxicas e induzem um amplo espectro de efeitos farmacológicos, os quais incluem, neurotóxico, cardiotoxico, miotóxico, hemolítico, convulsivo, anticoagulante, antiplaquetário, indução de edema e prejuízos teciduais (KINI, 2006).

Verheij e col. (1980) estudaram as propriedades anticoagulantes de fosfolipases A₂ e as classificaram em enzimas fortes, fracas e não-anticoagulantes.

Enzimas fosfolipases A_2 anticoagulantes fortes inibem a coagulação do sangue em concentrações abaixo de $2\mu\text{g/mL}$, já enzimas fosfolipases A_2 anticoagulantes fracas mostram efeitos entre 3 e $10\mu\text{g/mL}$, enquanto que outras enzimas fosfolipases A_2 não prologam significativamente o tempo de formação do coágulo em concentrações acima de $15\mu\text{g/mL}$.

Diversas enzimas fosfolipases A_2 que afetam a função plaquetária têm sido caracterizadas. No entanto, não há mecanismo geral estabelecido que indiquem que fosfolipases A_2 isoladas de peçonhas ofídicas inibem a ativação plaquetária ou induzem agregação plaquetária (DU et al., 2006). Os pontos isoelétricos destas enzimas variam de extremos ácidos e básicos, e esta propriedade afeta a especificidade de ligação e afinidade das fosfolipases A_2 sobre os fosfolipídios de membrana. No entanto, os valores de pI destas enzimas não é preditivo do seu efeito sobre a atividade plaquetária, por exemplo, as fosfolipases da peçonha de *Agkistrodon halys pallas* (CHEN et al., 1987) e praelonginas 2bIII da peçonha de *Acanthophis praelongus* (SIM, 1998) são ambas potentes inibidores plaquetários, porém seus pI s são 4,5 e 10,3, respectivamente. Chen e Chen (1989) isolaram uma fosfolipase A_2 ácida (pI 4,9) da peçonha de *Agkistrodon acutus* e mostraram que esta enzima apresenta um efeito inibidor sobre a agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno e araquidonato de sódio em plasma humano rico em plaquetas (PRP). No entanto, quando incubada com plaquetas lavadas, esta proteína torna-se um ativador e induz a agregação plaquetária. Interessantemente, Bthtx-II, uma fosfolipase A_2 básica com baixa atividade enzimática isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* (FULY et al., 2004), mostra agregação plaquetária em concentração-dependente tanto em PRP quanto em plaquetas lavadas.

As bases estruturais de fosfolipases A_2 que contribuem para a ampla diversidade de atividades ainda são incertas, portanto, outras investigações sobre as relações existentes entre atividade catalítica, bem como sítios de ligação ou receptores de membrana serão úteis para a compreensão do papel de fosfolipases A_2 secretadas de humanos e lançar luz sobre se estas enzimas estão envolvidas na agregação plaquetária ou na formação do trombo (DU et al., 2006).

Proteínas não-catalíticas de peçonhas de serpentes que afetam a hemostasia são principalmente desintegrinas e lectinas tipo-C. Desintegrinas são polipeptídeos de baixa massa molecular que apresentam uma seqüência tripeptídica (Arg-Gly-Lys-RGD) responsável pela inibição da agregação plaquetária por competir especificamente com integrinas, em particular receptores plaquetários GPIIb/IIIa. Por outro lado, lectinas tipo-C ligam seletivamente em proteínas de membrana plaquetária ou em fatores da coagulação sanguínea. Elas são proteínas de aproximadamente 30 kDa que consistem de associações covalentes de duas cadeias polipeptídicas idênticas ou homólogas e caracterizadas pela presença de domínio carboidrato (KINI; EVANS; 1990).

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 metaloproteases e serinoproteases.

As metaloproteases são proteínas que apresentam massa molecular que variam de 20 a 100 kDa e de acordo com a constituição do domínio, as metaloproteases de peçonhas ofídicas (SVMPs) podem ser classificadas em quatro grupos, designados PI, PII, PIII e PIV. O grupo PI é constituído por enzimas que possuem apenas o domínio metaloprotease, o grupo PII, inclui enzimas que apresentam o domínio metaloprotease, seguido por um domínio desintegrina-like (Dis-like), já o grupo PIII, são enzimas que possuem além dos domínios metaloprotease e Dis-like, têm o domínio rico em cisteína (Cys-like), e por fim, o grupo PIV, que compreendem enzimas com duas subunidades, ligadas através de pontes dissulfeto, em que uma das subunidades é constituída pelos três domínios característicos das enzimas PIII e a outra sendo uma proteína lectina tipo-C (FOX; SERRANO, 2005).

Essas proteases são dependentes de íons metálicos para exercerem suas funções biológicas, são altamente tóxicas e muitas apresentam ação fibrinogenolítica, sendo de grande interesse clínico no combate a formação de trombos (KAMIGUTI et al., 1996; BRAUD et al., 2000). Jararagina, uma toxina altamente versátil isolada de *Bothrops jararaca* é um exemplo clássico de uma metaloprotease hemorrágica da classe PIII que mostra efeitos em uma variedade de

diferentes mecanismos do sistema hemostático, podendo atuar em componentes como proteínas da membrana basal, proteínas coagulantes, plaquetas e células endoteliais (LAING; MOURA-DA-SILVA, 2005).

Por fim, as serinoproteases também são conhecidas por causarem desordens hemostáticas, interferindo em pontos distintos da coagulação sanguínea por degradação proteolítica ou seletivamente, por ativação ou inibição específica de fatores coagulantes envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (BRAUD et al., 2000).

Contudo, evidentemente toxinas apresentam atividades extremamente complexas e podem, usualmente, ser atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente para induzir um mesmo efeito e uma dada toxina pode ter várias atividades (CARDOSO, 2003). Estes estudos têm atraído considerável atenção já que são úteis como potentes ferramentas em testes laboratoriais, usos clínicos e como modelos teóricos de hemostasia e trombose.

1. 1. 6- Serinoproteases de peçonhas ofídicas (SVSPs)

Serinoproteases são abundantes especialmente em peçonhas das subfamílias Viperinae e Crotalinae, as quais representam cerca de 20% das proteínas totais. Geralmente elas não causam letalidade, mas contribuem com o efeito tóxico quando associadas com outras proteínas da peçonha (MARKLAND, 1998; BRAUD et al., 2000).

As SVSPs pertencem a uma grande família de peptidases, conhecida como Tripsina S1 de clan SA, pois possuem estrutura semelhante à tripsina, entretanto apesar desta similaridade estrutural elas freqüentemente atuam em substratos macromoleculares específicos (HALFON; CRAIK, 1998).

SVSPs em sua maioria possuem enovelamento típico da enzima digestiva quimotripsina, caracterizada pela presença de dois domínios assimétricos de folhas β , separados pela tríade catalítica e são definidas por um mecanismo catalítico

comum que inclui uma alta reatividade do resíduo serina que exerce um papel crítico na formação de um complexo transiente acil enzimático, o qual é estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico dentro do sítio ativo (LESK; FORDHAM, 1996). Estudos indicam que as SVSPs são constituídas de aproximadamente 231 resíduos de aminoácidos com doze resíduos de cisteína, os quais formam seis pontes dissulfeto (SERRANO; MAROUN, 2005).

Estudos de seqüências de aminoácidos dessa classe de proteases indicam que as SVSPs possuem um domínio catalítico formado por uma tríade de três resíduos: His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵, os quais são conservados em posições análogas em relação as serinoproteases de mamíferos, conforme a numeração do quimotripsinogênio (PERONA; CRAIK, 1997; MATSUI et al., 2000).

A alta reatividade da serina é demonstrada pela habilidade em reagir com reagentes como fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF) e diisopropilfluorofosfato (DFP), os quais formam um complexo inativo que é indefinidamente estável, tais reações ocorrem com a maioria das SVSPs (SERRANO; MAROUN, 2005).

Na enzima digestiva tripsina assim como nas SVSPs, o resíduo Asp¹⁸⁹, negativamente carregado, está posicionado na base do sítio ativo, estabelecendo a necessidade absoluta por resíduos básicos carregados positivamente como arginina ou lisina presentes no substrato. A presença de Asp¹⁸⁹ em todas as SVSPs explica a clivagem de pontes arginil no substrato. Alguns substratos cromogênicos ou fluorogênicos contêm arginina ou lisina posicionada de forma semelhante ao fibrinogênio, portanto tem sido utilizados para mensurar atividades amidolíticas ou esterolíticas de SVSPs (SILVA JÚNIOR; DE-SIMONE, 2004).

As SVSPs são glicoproteínas sintetizadas como zimogênios e possuem cadeia polipeptídica única com massas moleculares variadas, dependendo da quantidade de carboidratos que a molécula apresenta na estrutura. Além disso, elas diferem uma da outra pelo número variável de sítios de glicosilação N- ou O- ligados.

SVSPs apresentam um alto grau de semelhança na seqüência de aminoácidos, mas apesar disto, elas são altamente específicas em atuar em diferentes substratos tais como fibrinogênio, cininogênio e plasminogênio (SERRANO; MAROUN, 2005). Dessa forma, algumas SVSPs são ativas em um ou

mais substratos, enquanto outras apresentam atividade limitada, como é o caso de TSV-PA, um ativador de plasminogênio isolado da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* (ZHANG et al., 1995) e a toxina PA-BJ isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, que possui atividade específica responsável pela agregação plaquetária (SERRANO et al., 1995). Entretanto, apesar do esforço em entender a relação da estrutura e função dessas enzimas, as bases moleculares que definem a especificidade para o substrato ainda é pouco compreendida. Recentemente, o entendimento da relação estrutura-função tem melhorado bastante devido às análises cristalográficas por raios-x.

O alto grau de similaridade entre as SVSPs sugerem que elas divergiram de uma molécula ancestral comum. Itoh e col. (1988), relataram que a organização éxon/íntron do gene da batroxobina difere do gene da protrombina, mas é similar ao gene que leva a produção de calicreína. Isso indica que SVSPs divergiram da calicreína glandular, e ao longo da evolução as glândulas de serpentes sofreram alterações rápidas que levaram ao desenvolvimento de diversas funções fisiológicas.

1. 1. 7- Serinoproteases de peçonhas ofídicas com ação similar à trombina (SVTLEs)

Toxinas responsáveis por apresentarem atividade coagulante “*in vitro*” são encontradas em várias peçonhas de serpentes de diferentes gêneros. Essas toxinas são freqüentemente referidas como enzimas “thrombin-like” por mimetizarem algumas funções da trombina, como a capacidade em coagular o fibrinogênio.

A seqüência motivo do sítio ativo é altamente conservada nas SVTLEs, no entanto, existem algumas diferenças no que diz respeito à especificidade da atividade catalítica sobre o fibrinogênio, quando comparadas com a trombina. Algumas SVTLEs clivam ambas cadeias do fibrinogênio, $A\alpha$ e $B\beta$, liberando fibrinopeptídeos A (FpA) e fibrinopeptídeos B (FpB), mas a maioria delas atuam

preferencialmente em apenas uma das cadeias do fibrinogênio $A\alpha$ ou $B\beta$ (PIRKLE, 1998; MARKLAND, 1998; MATSUI et al., 2000; BORTOLETO et al., 2002).

Com base nessas características, SVTLEs têm sido classificadas de acordo com o produto liberado pela reação sobre o fibrinogênio como Fp-A, Fp-B ou Fp-AB (KORNALIK, 1990), no entanto pesquisadores atuais não sugerem essa designação pois Fp é produto da reação e não indica a classe enzimática.

Markland (1998) designou a subfamília das enzimas “thrombin-like” como venombinas A, B ou AB, para definir toxinas que atuam de forma semelhante a trombina, liberando fibrinopeptídeos A, B ou AB da molécula de fibrinogênio, respectivamente.

Recentemente, revisões de Castro e col., (2004), sugerem o uso da designação SVTLE para esta subfamília de serinoprotease. Assim, SVTLEs podem ser agrupadas de acordo com a liberação de fibrinopeptídeos em três categorias: SVTLE-AB, SVTLE-A, SVTLE-B, (Figura 4).

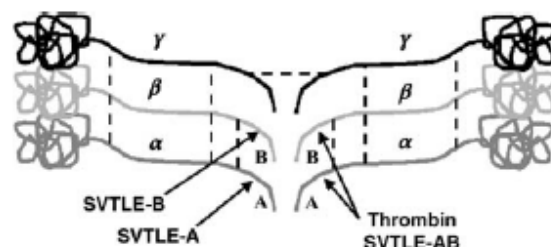


Figura 4: Comparação da via catalítica da trombina e SVTLEs sobre o fibrinogênio. Os símbolos α , β e γ representam as cadeias do fibrinogênio, enquanto que as letras A e B referem aos fibrinopeptídeos que foram liberados pela ação hidrolítica (CASTRO et al., 2004).

SVTLEs-AB são um grupo composto de enzimas que, como a trombina, desencadeiam a coagulação do fibrinogênio por liberar hidroliticamente ambos os fibrinopeptídeos A e B, como exemplos incluem neste grupo, jararacussina da peçonha de *Bothrops jararacussu* (BORTOLETO et al., 2002), THLE isolada de

Trimeresurus flavoviridis (KOMORI et al., 2002), kangshunmei de *Agkistrodon halys brevicaudus stejnegeri* (SAKAI et al., 2006), dentre outras.

SVTLEs-A são o grupo mais encontrado nas peçonhas ofídicas e caracterizadas por atuarem clivando o fibrinogênio liberando preferencialmente fibrinopeptídeo A e inclui enzimas coagulantes purificadas e descritas na literatura como a batroxobina isolada de *Bothrops atrox* (STOCKER; BARLOW, 1976), a crotalase isolada de *Crotalus adamanteus* (MARKLAND; DAMUS, 1971) e a ancrod isolada de *Calloselasma rhodostoma* (NOLAN et al., 1976). Estas são as enzimas clássicas e bem estudadas clinicamente e nas pesquisas básicas.

SVTLEs-B liberam preferencialmente fibrinopeptídeos B do fibrinogênio e são representadas, por exemplo, pelas enzimas contortrixobina isolada de *Agkistrodon contortrix contortrix* (AMICONI et al., 2000) e okinaxobina I isolada de *Trimeresurus okinavensis* (IWASAKI et al., 1990).

As SVTLEs, na maioria dos casos, não ativam o fator XIII da cascata de coagulação, o qual é responsável pela formação do coágulo denso, resultando em coágulos aberrantes e frágeis que são dissolvidos independentemente da ativação da plasmina, sendo portanto, rapidamente dispersos e removidos da circulação via sistema retículo-endotelial (STOCKER et al., 1982).

Algumas SVTLEs não são bem caracterizadas como é caso de habutobina isolada de *Trimeresurus flavoviridis* (SUNAGAWA et al., 2007) e elegaxobina isolada de *Trimeresurus elegans* (OYAMA; TAKAHASHI, 2000), ambas as enzimas atuam apenas sobre o fibrinogênio de coelhos, não mostrando algum efeito nos fibrinogênios bovino e humano. Em coelhos, as conversões do fibrinogênio-fibrina induzida por elas, liberam preferencialmente apenas fibrinopeptídeos A, por isso estão classificadas no grupo SVTLE-A.

SVTLEs não apresentam todas as multifunções da trombina, mas um número delas podem mimetizar outras funções desta enzima, tais como a ativação de fatores coagulantes ou indução da agregação plaquetária, embora os mecanismos pelos quais as SVTLEs trabalham provavelmente diferem daquelas enzimas de mamíferos (MATSUI et al., 2000).

Com base na literatura disponível, excluindo algumas exceções, a maioria das SVTLEs estudadas não ativam outros fatores da coagulação ou atuam sobre o fator XIII (PIRKLE, 1998). Entretanto, algumas SVTLEs são capazes de ativar fatores da coagulação, como é o caso da enzima contortrixobina, que é responsável por ativar os fatores XIII e V (AMICONI et al., 2000). Este comportamento singular também é observado para as enzimas botrombina e trombocitina isoladas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops atrox*, respectivamente, as quais ativam o fator VIII (CASTRO et al., 2004).

Acutrombina da peçonha de *Agkistrodon acutus* e cerastocitina de *Cerastes cerastes* também são responsáveis por ativar o fator XIII, assim como outras serinoproteases purificadas dos gêneros *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops*, *Cerastes* e *Trimeresurus* (PIRKLE, 1998). No caso da cerastocitina, ela também é capaz de ativar o fator X, que é uma característica rara e interessante na subfamília das SVTLEs.

SVTLEs possuem diferentes atividades biológicas no sistema hemostático e vale dizer que elas também podem atuar em outros processos, como nos sistemas complemento, nervoso e renal (TORRENT et al., 2007).

Contudo, a literatura mostra que as SVTLEs são extremamente diversas podendo apresentar atividades específicas próprias o que as tornam como importantes ferramentas para a investigação de mecanismos biológicos.

1. 1. 8- Aplicações terapêuticas de SVTLEs na hemostasia

Trombose arterial e venosa são as principais causas de morbidade e mortalidade em humanos. Estratégias em inibir a trombogênese têm como principal objetivo a utilização de medicamentos que bloqueiam a função plaquetária, mas elas freqüentemente incluem anticoagulantes que previnem a deposição de fibrina, já que trombos são formados principalmente de células sanguíneas e fibrina (HENRIQUES et al., 2004).

Serino proteases, especialmente aquelas com atividade “thrombin-like” e calicreína-like são ferramentas importantes nos estudos de aplicações clínicas e bioquímicas. Desde 1970, SVTLEs têm sido extensamente estudadas em pesquisas básicas e clínicas devido à potencial aplicação terapêutica incluindo infarto do miocárdio, isquemia aguda e desordens do sistema de coagulação sanguínea (MARKLAND, 1998; KORNALIK, 1985).

Diferente da trombina que produz coágulos firmes e resistentes, SVTLEs hidrolizam o fibrinogênio produzindo coágulos mais frágeis facilmente dissolvidos pelo sistema fibrinolítico. O resultado é uma rápida diminuição do estoque de fibrinogênio “*in vivo*”, causando efeito anticoagulante e desfibrinogenante, que por consequência reduz a viscosidade do sangue e melhora do fluxo sanguíneo, contribuindo assim parcialmente para o prolongamento do tempo de oclusão (HENRIQUES et al., 2004; MARKLAND, 1998).

São bastante conhecidas e utilizadas como agentes desfibrinogenantes as enzimas: ancrod (Knoll, Ludwigshafen, Alemanha) isolada de *Callosellasma rhodostoma*, batroxobina (Reptilase, Pentapharm, Basel, Switzerland) isolada da peçonha de *Bothrops atrox* e crotalase isolada de *Crotalus adamanteus*. Estas três enzimas apresentam atividades coagulantes “*in vitro*”, proteolítica e esterásica, embora o mecanismo básico da ação desfibrinogenante seja um efeito proteolítico sobre o fibrinogênio circulante.

Ancrod e batroxobina têm sido usadas em pacientes com trombose de veias profundas, infarto do miocárdio e trombose arterial periférica. O tratamento é bem tolerado e os efeitos colaterais sérios são raros (STOCKER et al., 1976).

Batroxobina também é útil em testes diagnósticos para mensurar níveis de fibrinogênio em presença de heparina (Tempo Reptilase), para caracterizar funções do fibrinogênio em desfibrinogenemias e para remover fibrinogênio de amostras para testes trombina-dependente. A presença de produtos de degradação de fibrina, hipofibrinogenemia e defeitos na polimerização de fibrina (desfibrinogenemia), acarretam em prolongamento do tempo Reptilase.

Estudos recentes sugerem que o uso de Ancrod em pacientes com choque isquêmico resulta em melhoras, além do baixo custo médico comparado com outros

medicamentos e uso seguro, terapêuticamente, em pacientes com síndrome de heparina associados a trombocitopenia e trombose (MARSH; WILLIAMS, 2005).

As “thrombin-like” também são capazes de formar a “cola de fibrina”, que é um efetivo agente hemostático e selante para tecidos defeituosos e têm sido largamente empregado em muitos processos cirúrgicos. Os componentes desta cola são o fibrinogênio, a trombina e íons cálcio e seu mecanismo de ação é imitar o sistema de coagulação para interromper o extravasamento sanguíneo. Em presença de trombina e íons cálcio, moléculas de fibrinogênio são proteolicamente clivadas e convertidas em monômeros de fibrina. Uma vez aplicado no paciente, a cola é aos poucos reabsorvida por fibrinólise.

A “cola de fibrina” pode ser utilizada como agente hemostático em vários procedimentos cirúrgicos, tais como esplenectomia, preservação esplênica, trauma hepático, cirurgias cardiotorácicas, utilizada também como selante em ruptura de tendões, de nervos, em neurocirurgias, em oftalmologia nas técnicas de microcirurgias, além de muitos outros procedimentos cirúrgicos (WANG, M-C et al., 1995).

Esses estudos permitem-nos inferir que estas toxinas podem ser utilizadas como ferramentas para a investigação da função plaquetária, como também na elaboração de fármacos, que atuam no equilíbrio hemostático, e agentes desfibrinogénantes terapêuticos (ROSENFELD, 1971; BORTOLETO et al., 2002).

Atualmente, o conhecimento da composição protéica das peçonhas de serpentes, tem assumido uma importância significativa, não apenas no aspecto terapêutico específico ligado a acidentes ofídicos, mas também por seu amplo potencial farmacológico, onde toxinas isoladas têm se revelado como valiosos instrumentos de pesquisa nas diversas áreas do conhecimento.

O conhecimento humano sobre as substâncias integrantes da peçonha de serpentes tem exercido uma importância maior que o entendimento da peçonha como um todo. Para se compreender a extrema complexidade destes venenos é importante extrairmos deles seus diversos constituintes e examinarmos suas propriedades individuais. Uma vez identificados, pode-se investir em pesquisas para

combater ou explorar determinados efeitos causados por componentes específicos da peçonha.

Assim, a utilização de enzimas proteolíticas como ferramentas poderosas para a elucidação de mecanismos de ação de fenômenos biológicos é um campo aberto e inesgotável nas investigações científicas.

Portanto, há interesse em conhecer melhor componentes específicos de peçonha para melhor compreender fenômenos biológicos que estas toxinas provocam no sistema hemostático de mamíferos.

1.2- Referências bibliográficas

AMICONI, G.; AMORESANO, A.; BOUMIS, G.; BRANCACCIO, A.; DE CRISTOFARO, R.; DE PASCALIS, A.; DI GIROLAMO, S.; MARAS, B.; SCALONI, A. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. **Biochemistry**, v.39, p.10294-10308, 2000.

ARAÚJO, M. S.; MARTINS, M. The defensive strike of five species of lanceheads of the genus *Bothrops* (Viperidae). **Braz. J. Biol.**, v.67(2), p.327-332, 2007.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Recording of venomous bites and stings by National Information Systems in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v.18(3), p.735-146, 2002.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cad. Saúde Pública**, v.19(1), p.7-16, 2003.

BODE, W. Structure and interaction modes of thrombin. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.36, p.122-130, 2006.

BORTOLETO, R. K.; MURAKAMI, M. T.; WATANABE, L.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification, characterization and crystallization of jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v.40, p.1307-1312, 2002.

BRASIL, M. S. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v.82, p.851-859, 2000.

BUTENAS, S.; MANN, K. G. Blood coagulation. **Biochemistry**, v.67, p.3-12, 2002.

CARDOSO, J. L.. C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, p.843-856, 2004.

CHEN, R. H.; CHEN, Y. C. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon acutus* (five pace snake) and its effect on platelet aggregation. **Toxicon**, v.27, p.675-682, 1989.

CHEN, Y. C.; MARAGANORE, I.; REARDON, R. L. HEINRIKSON. Characterization of the structure and function of three phospholipases A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. **Toxicon**, v.25, p.401-409, 1987.

COATES, M.; RUTA, M. Nice snake, shame about the legs. **Trends Ecol. Evol.**, v.15, p.503-507, 2000.

DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v.379, p.537-540, 1996.

DA SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v.41, p.251-255, 2003.

DAVIE, E. W. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278 (51), p.50819-50832, 2003.

DU, X-Y; SIM, D. S.; LEE, W-H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.36, p.414-421, 2006.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v.45, p.969-985, 2005.

FULY, A. L.; SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; GUIMARÃES, J. A. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v.86, p-731-739, 2004.

GRAHAM, R. L. J.; GRAHAM, C.; THEAKSTON, D.; McMULLAN, G.; SHAW, C. Elucidation of trends within venom components from the snake families Elapidae and Viperidae using gel filtration chromatography. **Toxicon**, doi:10.1016/j.toxicon.2007.08.010, 2007.

HALFON, S.; CRAIK, C. S. Introduction: serine peptidases and their clans. In: Barret, A. J.; Rawlings, N. D.; Woessner, J. F. (Eds). **Handbook of Proteolytic Enzymes Academic Press**, 1998. p.3-4.

HARKER, L. A. The role of platelets in the early and late vascular responses initiated by mechanical vascular injury. **Fibrinolysis Proteolysis**, v.11, p.97-103, 1997.

HARTWING, J. H. Platelet morphology and shape change. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. (Eds). 3 ed. **Thrombosis and hemorrhage**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. p.140-160.

HENRIQUES, E. S.; FONSECA, N.; RAMOS, M. J. On the modeling of snake venom proteinase interactions with benzamidine-based thrombin inhibitors. **Protein Science**, v.13, p.2355-2369, 2004.

ITOH, N.; TANAKA, N.; FUNAKOSHI, I.; KAWASAKI, T.; MIHASHI, S.; YAMASHIMA, I. Organization of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. Homology with the trypsin/kallikrein gene family. **Journal Biological Chemistry**, v.263, p.7628-7631, 1988.

IWASAKI, A.; SHIEH, T. C.; SHIMOHIGASHI, Y.; WAKI, M.; KIHARA, H.; OHNO, M. Purification and characterization of a coagulant enzyme, okinaxobin I, from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (Himehabu snake) which releases fibrinopeptide B. **J. Biochem.**, v.108, p.822-828, 1990.

JANSEN, M. First records of *Bothrops pauloensis* Amaral, 1925 (Serpentes: Viperidae) in Bolivia. **Kempffiana**, v.2(1), p. 66-71, 2006.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pit viper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, v.299, p.279-291, 2002.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinase. **Toxicon**, v.34, p.627, 1996.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v.27, p.613-635, 1989.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, v.28, p.1387-1422, 1990.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.**, v.397, p.377-387, 2006.

KOMORI, Y.; TANAKA, K.; NIKAI, T. Characterization of Habu thrombin-like enzyme (THLE) with a new n-terminal sequence from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (habu). **J. Nat. Toxins**, v.11, p.205-212, 2002.

KORNALIK, F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. **Pharmac. Ther.**, v.29, p.353-405, 1985.

KORNALIK, F. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: SHIER W. T.; MEBS, D. (Eds). **Handbook of Toxicology**, v.18. New York: Marcel Dekker, 1990. p.697-709.

KROLL, M. H.; RESÉNDIZ, J. C. Mechanisms of platelet activation. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. (Eds). 3 ed. **Thrombosis and hemorrhage**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. p.187-205.

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v.45, p.987-996, 2005.

LESK, A. M.; FORDHAM, W. D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Journal Molecular Biology**, v.258, p.501-537, 1996.

MARKLAND, F. S.; DAMUS, P. S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus*. **J. Biol. Chem.**, v.246, p.6460-6473, 1971.

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

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v.45, p.1171-1181, 2005.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1477, p.146-156, 2000.

NOLAN, C.; HALL, L. S.; BARLOW, G. H. Ancrod, the coagulation enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. In: LORAND, L. (Ed.). **Methods in Enzymology**, v.45. New York: Academic Press, 1976. p.205-214.

OLIVEIRA, R. B.; RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Risk factors associated with coagulation abnormalities in *Bothrops* envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36(6), p.657-663, 2003.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon**, v.38, p.1087-1100, 2000.

PEERSCHKE, E. I. B.; LÓPEZ, J. A. Platelet membranes and receptors. In: Loscalzo, J.; Schafer, A. I. (Eds). 3 ed. **Thrombosis and hemorrhage**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. p.161-186.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272(48), p.29987-29990, 1997.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.47(1), p.24-29, 2001.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thromb. Haemost.**, v.79, p.675-683, 1998.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. (Eds). **Venomous and Their Venoms 2**. New York: Academic Press, 1971. p.345.

SAKAI, J.; ZHANG, S.; CHEN, H.; ATSUMI, F.; MATSUI, T.; SHIONO, H.; SANADA, S.; OKADA, T. Primary structure of a thrombin-like serine protease, kangshunmei, from the venom of *Agkistrodon halys brevicaudus stejnegeri*. **Toxicon**, v.48, p.313-322, 2006.

SALAZAR, A. M.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; GIRÓN, M. E.; AGUILAR, I.; GUERRERO, B. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. **Thrombosis Research**, doi:10.1016/j.thromres.2006.07.004, 2006.

SANCHEZ, E. F.; SWENSON, S. Proteases from South American snake venoms affecting fibrinolysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.3(2), p.1-11, 2007.

SBH. 2007. Brazilian reptiles – List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>> Acesso em 30 nov.2007.

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

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v.45, p.1115-1132, 2005.

SILVA, V. X. **Revisão sistemática do complexo (Serpentes, Viperidae, Crotalinae)**. 2000. 134f. Tese (Doutorado em Ecologia). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2000.

SILVA JR., F.P.; DE-SIMONE, S. G. S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.12, p.2571-2587, 2004.

SIM, K. L. Purification and preliminary characterization of praelongin phospholipases, antiplatelet agents from the snake venom of *Acanthophis praelongus*. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1379, p.198-206, 1998.

SOUSA, J. R. F.; MONTEIRO, H. C.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, v.39, p.787-792, 2000.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (bathroxobin). In: LORAND, L. (Ed.). **Methods of Enzymology**, v.45B. New York: Academic Press, 1976. p.214.

STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, v.20, p.265-273, 1982.

SUNAGAWA, M.; NAKAMURA, M.; KOSUGI, T. Cloning of habutobin cDNA and antithrombotic activity of recombinant protein. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.362, p.899-904, 2007.

TORRENT, R. M. R.; BONGIOVANNI, B.; LEIVA, L. C.; DUFFARD, A. M. E.; RODRÍGUEZ, J. P.; PÉREZ, O. C. A.; DUFFARD, R. Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study). **Toxicon**, v.50, p.144-152, 2007.

VERHEIJ, H. M.; BOFFA, M. C.; ROTTEN, C.; BRYCKERT, M. C.; VERGER, R.; DE HAAS, G. H. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A₂. **Eur. J. Biochem.**, v.112, p. 25-32, 1980.

WHITE, J. Snake venom and coagulopathy. **Toxicon**, v.45, p.951-967, 2005.

WOLBERG, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. **Blood Reviews**, doi:10.1016/j.blre.2006.11.001, 2007.

WANG, M-C; PINS, G. D.; SILVER, F. H. Preparation of fibrin glue: the effects of calcium chloride and sodium chloride. **Materials Science and Engineering C**, v.3, p.131-135, 1995.

ZHANG, Y.; WISNER, A.; XIONG, Y.; BON, C. A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. **Journal Biological Chemistry**, v.270, p.10246-10255, 1995.

**Caracterização bioquímica e funcional de uma nova “Thrombin-like” isolada da
peçonha de *Bothrops pauloensis***

Fábio L. Costa ^a, Renata S. Rodrigues ^a, Luiz F. M. Izidoro ^a, Amélia Hamaguchi ^a, Maria I. Homs-Brandeburgo ^a, Andreimar M. Soares ^b, André L. Fuly ^c, Sandro G. Soares ^d, Heloisa S. Selistre-de-Araújo ^e and Veridiana M. Rodrigues ^{a*}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brasil

^b Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil

^c Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, UFF, Niterói, RJ, Brasil

^d Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil

^e Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, Brasil

*Corresponding author: Prof. Dr. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e-mail: veridiana@ingeb.ufu.br FAX. 55 34-3218-2203.

Abreviaturas: TI-Bp, enzima “thrombin-like” isolada da peçonha de *B. pauloensis*; TFA, ácido Tricloroacético; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; MCD, dose mínima coagulante; TAME, N α -p-tosyl-L-arginine methyl ester.

Resumo

Serino proteases isoladas de peçonhas ofídicas têm um importante papel na formação e dissolução de coágulos. Essas toxinas principalmente, as enzimas “thrombin-like” afetam o sistema hemostático resultando em incoagulabilidade sanguínea. No presente estudo, uma enzima “thrombin-like” nomeada TI-Bp foi isolada de *Bothrops pauloensis* e características bioquímicas, enzimáticas e farmacológicas foram determinadas. TI-Bp é uma glicoproteína que contém ambos, carboidratos N-ligados e ácido siálico na estrutura, possui PM = 34 kDa sob condições redutoras e pI ~ 6,4. A seqüência N-terminal da enzima (VIGGDECDINEHPFL) mostrou alta similaridade quando comparada com outras toxinas “thrombin-like” isoladas de peçonhas ofídicas. TI-Bp mostrou alta atividade coagulante sobre os plasmas bovino e humano e foi inibida por PMSF, benzamidina e leupeptina. Além disso, mostrou estabilidade quando examinadas em diferentes temperaturas (- 70°C a 37°C), pHs (3 a 9) e presença de íons metálicos divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+}). TI-Bp mostrou alta atividade catalítica sobre substratos naturais como o fibrinogênio e sintético, tais como o TAME, S-2238 e S-2288, além disso, mostrou atividade caliceína-like, mas foi incapaz de atuar sobre o S-2765 e substrato da plasmina. A enzima não demonstrou atividade hemorrágica, miotóxica, indução de edema e agregação plaquetária, assim como atividade proteolítica sobre a caseína. Analisados juntos, nossos resultados mostram que TI-Bp é uma nova isoforma de enzima “thrombin-like” isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*.

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis*; peçonhas de serpentes; coagulação; atividade proteolítica; enzimas “thrombin-like”.

Abstract

Serine proteinases isolated from snake venom have an important role in the formation and dissolution of clots. These toxins primarily, the thrombin-like enzymes affect the hemostatic system resulting in blood incoagulation. At present study, a thrombin-like enzyme named TI-Bp was isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom and its biochemical, enzymatic and pharmacological characteristics were determined. TI-Bp is a glycoprotein that contain both carbohydrates N-linked and sialic acid in its structure, has $M_r = 34,000$ at reducing conditions and $pI \sim 6.4$. The N-terminal sequence of the enzyme (VIGGDECDINEHPFL) showed high similarity when compared with other thrombin-like enzymes isolated from snake venoms. TI-Bp showed high clotting activity upon bovine and human plasma and was inhibited by PMSF, benzamidine and leupeptin. Moreover, showed stability when examined at different temperatures (-70°C to 37°C), pHs (3 to 9) and presence of divalent metal ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+}). TI-Bp showed high catalytic activity upon natural substrates such as fibrinogen and synthetic, such as TAME, S-2238 and S-2288, moreover, showed kallikrein-like activity, but was unable to act upon S-2765 and plasmin substrate. The enzyme did not induce hemorrhage, myotoxicity, edema and platelet aggregation as well as proteolytic activity upon casein. Take together, our data show that TI-Bp is a new thrombin-like enzyme isoform isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom.

Keywords: *Bothrops pauloensis*; snake venom; blood coagulation; proteolytic enzymes; thrombin-like enzymes.

2. 1- Introdução:

Mundialmente ocorrem a cada ano, segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 1.250.000 a 1.665.000 acidentes por serpentes peçonhentas, com 30.000 a 40.000 mil mortes. Destas serpentes, mais de cem espécies são conhecidas por afetarem o sistema hemostático por uma variedade de mecanismos (MARKLAND, 1998).

Os componentes da peçonha podem estimular ou inibir várias etapas da hemostasia, incluindo a cascata de coagulação sanguínea, fibrinólise, hipotensão, integridade vascular e função plaquetária (BRAUD et al., 2000; MATSUI et al., 2000; WHITE, 2005).

Os principais componentes ativos que interferem na hemostasia podem ser agrupados como: 1) Procoagulantes: pertencem a este grupo, os ativadores de fatores V, X, IX e protrombina, além de proteases com ação similar à trombina, conhecidas como enzimas "thrombin-like". 2) Anticoagulantes: ativador de proteína C, proteínas que ativam a formação do complexo fator IX/X, inibidores de trombina e fosfolipases A₂. 3) Fibrino(geno)líticas: proteínas que degradam o fibrinogênio e ou fibrina e toxinas ativadoras de plasminogênio. 4) Proteínas que interagem com superfícies vasculares: as hemorraginas. 5) Atividade sobre plaquetas: incluem toxinas que induzem ou inibem a agregação plaquetária. 6) Ativadores de proteínas do plasma: pertencem ao grupo os inibidores, conhecidos como serpinas (WHITE, 2005).

Muitas dessas toxinas de serpentes que interferem na hemostasia são enzimas, como as fosfolipases A₂, nucleotidasas, fosfodiesterases, L-amino oxidases, metaloproteases e serinoproteases, enquanto outras, tais como desintegrinas e lectinas tipo-C, não possuem atividade enzimática (MARKLAND, 1998).

Os dois principais grupos de proteases sintetizados pelas glândulas exócrinas de serpentes peçonhentas e que são responsáveis por alterações na hemostasia são conhecidos como metaloproteases e serinoproteases. Esses grupos compõem

toxinas que possuem seqüências altamente homólogas e conservadas durante a evolução e isto tem sido um fator crítico para a sobrevivência das diferentes classes de enzimas.

Serinoproteases são abundantes especialmente em peçonhas das subfamílias Viperinae e Crotalinae. Elas pertencem a uma família de peptidases, conhecida como Tripsina S1 de clan SA (LESK; FORDHAM, 1996; HALFON; CRAIK, 1998) e são caracterizadas por um mecanismo catalítico comum que inclui uma alta reatividade do resíduo serina na posição 195 (PERONA; CRAIK, 1997; MATSUI et al., 2000; SILVA JÚNIOR; DE-SIMONE, 2004). Apesar da similaridade estrutural com a tripsina, elas são altamente específicas em atuar em diferentes substratos tais como fibrinogênio, cininogênio e plasminogênio (BRAUD et al., 2000; SERRANO; MAROUN, 2005).

Serinoproteases responsáveis por apresentarem atividade coagulante “*in vitro*” são encontradas em várias peçonhas de serpentes de diferentes gêneros. Essas toxinas são freqüentemente referidas como enzimas “thrombin-like” por mimetizarem algumas funções da trombina, como a capacidade em coagular o fibrinogênio (STOCKER et al., 1982; KORNALIK, 1985; PIRKLE, 1998). Enzimas “thrombin-like” de peçonhas ofídicas (SVTLEs) podem atuar clivando ambas cadeias do fibrinogênio, $A\alpha$ e $B\beta$, liberando fibrinopeptídeos A (FpA) e fibrinopeptídeos B (FpB), mas a maioria delas atuam preferencialmente em apenas uma das cadeias do fibrinogênio $A\alpha$ ou $B\beta$ (PIRKLE, 1998; MARKLAND, 1998; MATSUI et al., 2000; CASTRO et al., 2004). Portanto, SVTLEs podem ser agrupadas de acordo com a liberação de fibrinopeptídeos em três categorias: SVTLE-AB, SVTLE-A e SVTLE-B (CASTRO et al., 2004).

Na maioria dos casos, os monômeros de fibrina formados pela atividade de SVTLEs não possuem ligações cruzadas, pois estas enzimas não ativam a transglutaminase responsável pelo último passo da formação e estabilização das redes de fibrina, levando como consequência “*in vivo*” um acentuado efeito anticoagulante (ROSENFELD, 1971; STOCKER et al., 1982; KORNALIK, 1985; KORNALIK, 1990; MARSH; WILLIAMS, 2005).

Portanto, as SVTLEs mostram-se interessantes modelos moleculares para o desenvolvimento de novas drogas ou agentes terapêuticos, principalmente por serem resistentes a inibidores de proteases fisiológicos, como as serpinas (MATSUI et al., 2000; SERRANO; MAROUN, 2005). Estas enzimas possuem inúmeras aplicações terapêuticas dentre elas o tratamento de trombose arterial e venosa, infarto do miocárdio, isquemia aguda e desordens do sistema de coagulação sanguínea (KORNALIK, 1985; MARKLAND, 1998; HENRIQUES et al., 2004; MARSH; WILLIAMS, 2005).

O gênero *Bothrops* (família Viperidae, subfamília Crotalinae) é responsável pela maioria dos acidentes que ocorrem no Brasil. *Bothrops pauloensis*, popularmente conhecida como 'jararaca-pintada' habita todo o território brasileiro, exceto na Bacia Amazônica. São encontradas, principalmente em zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (CARDOSO, 2003; WHITE, 2005; ARAÚJO; MARTINS, 2007). A peçonha produzida por esses animais possui alta atividade proteolítica com intensos efeitos hemorrágicos e toxinas capazes de ativar a cascata de coagulação induzindo incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio (PINHO; PEREIRA, 2001). No presente trabalho, isolamos e caracterizamos química e funcionalmente a primeira SVTLE da espécie *Bothrops pauloensis*.

2. 2- Materiais

A peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis* foi obtida a partir de espécimes mantidas no serpentário da Pentapharm, Minas Gerais, Brasil. O plasma bovino foi obtido na fazenda experimental da Universidade Federal de Uberlândia.

CM-Sepharose e Phenyl Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). Acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, SDS, EDTA, azul de bromofenol, fucsina básica, Coomassie Brilliant Blue R-250, Coomassie Brilliant Blue G, glicina, soroalbumina bovina, trombina, fibrinogênio, persulfato de amônio, TAME,

fibrinogênio bovino, caseína bovina, inibidores enzimáticos como: aprotinina, benzamidina, 1,10-fenantrolina, leupeptina, EDTA, PMSF e β -mercaptoetanol (Sigma Chem. Co.), substratos cromogênicos (S-2238, S-2288, S-2765, S-2251, S-2266 e S-2302, todos da Chromogenix) e padrão de peso molecular (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). Os demais reagentes eram de grau analítico.

Camundongos da raça Swiss machos, (18-22g) foram fornecidos pelo Instituto Valle, Minas Gerais, Brasil e mantidos no biotério do Laboratório de Experimental Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia sob condições padrões de temperatura 25⁰C, umidade relativa do ar de 60-65%, ciclo de 12h de luz/noite, dieta e água “*ad libitum*”.

2. 3- Métodos

2. 3. 1- Fracionamento da Peçonha Bruta de *Bothrops pauloensis* e obtenção da “thrombin-like” TI-Bp

a) Cromatografia de troca iônica da peçonha de *Bothrops pauloensis* em gel de CM-Sepharose

Uma amostra de 200mg do veneno de *B. pauloensis* (Bp) foi ressuspensa em 2 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, centrifugada a 480 X g durante 10 minutos a 4⁰C e o sobrenadante límpido obtido foi aplicado em uma coluna de troca iônica contendo a resina CM-Sepharose (2,0 x 20,0 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão.

As proteínas foram eluídas em temperatura ambiente com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 - 0,5 M), pH 7,8. Frações de 3,0mL/tubo foram coletadas num fluxo de 20mL/hora por um coletor de frações

REDIFRAC (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). Cada fração coletada foi monitorada por absorvância a 280nm em um espectrofotômetro SPEKOL UV VIS (Zeiss). Após traçar o cromatograma as amostras de proteínas foram reunidas em “pools”, liofilizadas e armazenadas a -20° C.

b) Cromatografia da fração CM4 em gel de hidrofobicidade Phenyl-Sepharose CL-4B

A fração CM4 (10mg) obtida da cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose foi dissolvida em 1mL de tampão Tris-HCl 10mM pH 8,5 + NaCl 4M, sendo posteriormente aplicada em uma coluna de afinidade (1,0 x 7,0cm) contendo a resina Phenyl-Sepharose CL-4B, equilibrada com o mesmo tampão.

As amostras foram eluídas a temperatura ambiente iniciando-se com o tampão de equilíbrio (Tris-HCl 10mM pH 8,5 + NaCl 4M) e posteriormente com soluções decrescentes de concentração molar de NaCl (3M, 2M, 1M, 0,5M), seguindo com Tris-HCl 10mM pH 8,5 e finalmente com água destilada. Foram coletadas frações de 2,5mL/tubo num fluxo de 20mL/hora no coletor de frações REDIFRAC (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). A eluição de cada fração foi monitorada por absorvância à 280nm em um espectrofotômetro SPEKOL UV VIS (Zeiss). Após traçar o cromatograma as amostras de proteínas foram reunidas em “pools” e a fração com atividade específica coagulante e esterásica foi submetida a um sistema de ultrafiltração (AMICON YM 10) lavando-se pelo menos duas vezes com água destilada e posteriormente foi liofilizada e armazenada a -20° C.

c) Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-RP)

Aproximadamente 1mg da fração P4 foi diluído em 550µl de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) e submetido em um sistema de RP-HPLC, coluna

Shimadzu CLC-ODS C-18 (octacil sulfonila) (2,0 x 25,0cm). A eluição da amostra foi inicialmente realizada em ácido trifluoracético 0,1% (v/v), seguindo com gradiente de concentração linear de acetonitrila 70% em um fluxo de 1mL/min a temperatura ambiente. O pico único foi separado e liofilizado para a determinação das propriedades químicas e estruturais.

2. 3. 2- Determinação quantitativa de proteínas

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras, soluções contendo de 5 a 50 μ g de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método de Bradford, (1976). A reta padrão foi construída com soroalbumina bovina, considerando-se o seu coeficiente de extinção molar em 280 nm (0,665). Após a dosagem, o material restante foi separado em alíquotas de 100 μ g que posteriormente foram liofilizados e armazenados a -20° C.

2. 3. 3- Caracterização Química

2. 3. 3. 1- Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes (SDS) foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli, (1970).

Para o gel de separação foram utilizadas as seguintes soluções: Tris-HCl 2M pH 8,8 , Acrilamida:Bis 30:0,8, Temed 1% e persulfato de amônio 1%. Enquanto que, para o gel de empilhamento foram utilizados: Tris-HCl 2M pH 6,8 , Acrilamida:Bis 30:08 , Temed 1% e persulfato de amônio 1%. A solução de trizma base 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1% pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução para o ânodo. As amostras contendo 10 μ g de proteínas foram

dissolvidas em 20 μ L do tampão STOP (Tris-HCl 0,06M pH 6,8, SDS 6%, Azul de Bromofenol 0,001%, Glicerol 10% e 10 μ L de β -mercaptoetanol 10%). Em seguida, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 100°C. A eletroforese foi conduzida a 20mA de corrente, por aproximadamente 50 minutos, até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel.

Terminada a migração o gel foi submetido em coloração por prata seguindo um protocolo da Pharmacia Biotech. O peso molecular foi estimado pelo padrão de peso molecular 7L (Sigma), contendo as seguintes proteínas: soroalbumina bovina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica (29kDa), tripsinogênio (24kDa), inibidor de tripsina (20.1kDa), α -lactoalbumina (14.4kDa).

2. 3. 3. 2- Focalização isoelétrica

A eletrofocalização da enzima TI-Bp isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* foi realizada segundo o método descrito por Vestberg (1972), com algumas modificações como descrito a seguir. O experimento foi realizado no Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, com a colaboração da Profa. Dra. Eliane C. A. Braga.

O gel foi preparado a 7% (m/v) em acrilamida (solução estoque: bis-acrilamida 0,8:30), contendo 1,3g de sacarose, 650 μ L de anfólitos (Pharmacia 40% de pl variável de 3,0 a 10,0), 0,17% de TEMED (v/v) e 0,075% de persulfato de amônio (m/v). A solução do gel foi completada para um volume final de 10mL de água destilada e polimerizado em placa de vidro 12X14cm utilizando como suporte uma borracha em forma de U.

O gel foi colocado sobre uma placa refrigerada ligada a um banho termostático a 4°C. A placa milimetrada foi previamente umedecida com glicerina, para melhor refrigeração do gel. Dois *strips* da Pharmacia Biotech foram utilizados para conectar o gel e os eletrodos de platina, sendo o cátodo embebido em uma

solução de NaOH 1M e o ânodo em ácido fosfórico 1M. Os eletrodos de platina foram centralizados sobre as tiras de papel e o sistema então fechado.

A fonte de alta voltagem foi ajustada para valores máximos de 500V, 10mA, 3 Watts e 30 minutos para a realização de uma pré-corrída. Em seguida, as amostras foram aplicadas sempre no cruzamento de duas linhas azuis, exatamente sobre a linha mais central do gel. A fonte foi programada para 1500V, 15mA, 10 Watts e 5h. O final da corrida foi determinado quando a fonte marcasse uma alta voltagem e uma baixa amperagem (cerca de 1mA).

Após a focalização isoeletrica, foram seccionados cerca de 1cm de largura (no sentido do comprimento) de cada extremidade do gel e colocados em tubos de ensaio contendo 200 μ L de água destilada para a leitura do pH após 2 horas em repouso e em seguida, foi construído o gráfico de determinação do gradiente de pH.

O restante do gel contendo as amostras foi fixado em solução de ácido tricloroacético por 30 minutos, prosseguindo com a utilização de um kit para coloração por prata seguindo um protocolo da Pharmacia Biotech.

2. 3. 3. 3- Seqüência N-terminal

A análise da seqüência N-terminal da enzima purificada foi realizada em um sequenciador automático de proteínas da Shimadzu (modelo PPSQ-23A). Uma solução com aproximadamente 1mg/mL da enzima foi aplicada no seqüenciador e determinado pelo método de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967). O experimento foi realizado no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Carlos, com a colaboração da Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre-de- Araújo. A seqüência N-terminal e homologia de aminoácidos foram analisadas por alinhamento usando programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

2. 3. 4- Caracterização Enzimática

2. 3. 4. 1- Atividade coagulante

A atividade coagulante das amostras foi realizada segundo Assakura e col. (1992), com algumas modificações. Para essas reações foram utilizados 150 μ L de plasma bovino citratado e diferentes quantidades de enzimas (0.1-12.0 μ g) em 50 μ L de salina, em ordem para determinar a dose mínima coagulante (DMC).

A DMC foi definida como a quantidade de enzima necessária para coagular o plasma bovino citratado à 37⁰C durante 60 segundos de reação, o que é equivalente a 1U(unidade). A DMC encontrada foi utilizada para estudos de estabilidade da proteína, quando pré-incubadas por 20 minutos a diferentes pHs (1.0 a 13.0), temperaturas (-70⁰C a 100⁰C), presença de diferentes íons divalentes 10mM (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Cu⁺⁺, Zn⁺⁺ e Mn⁺⁺) e diferentes inibidores (β -mercaptoetanol 10mM, EDTA 10mM, aprotinina 10mM, PMSF 10mM, benzamidina 10mM e leupeptina 1mM).

Os ensaios de coagulação foram realizados em um analisador de coagulação micro-processador Quick-Timer (DRAKE LTDA). O modelo Quick-Timer determina o tempo de coagulação de uma amostra de plasma bovino utilizando um sistema óptico que detecta a variação brusca da densidade ótica da amostra no instante da coagulação.

Assim que a amostra era adicionada ao plasma bovino, o cronômetro do aparelho era acionado registrando o tempo (em segundos) necessário para a formação da rede de fibrina. Os tempos obtidos foram comparados ao controle positivo (peçonha bruta) para verificar se houve ou não diminuição do tempo de coagulação.

2. 3. 4. 2- Atividade fibrinogenolítica

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi realizada segundo Rodrigues e col., (2000) como descrito a seguir. Em 50 μ L de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5mg/mL água) foram incubados diferentes concentrações da enzima (0,1 μ g; 0,5 μ g; 1 μ g; 3 μ g; 5 μ g e 10 μ g) a 37°C durante 1 hora.

O mesmo procedimento foi realizado incubando-se 5 μ g de TI-Bp com 50 μ L de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL) em diferentes intervalos de tempos (0h, 5min., 15min, 30min., 45min., 1h e 2h) a 37°C.

Estudos de estabilidade da enzima foram realizados em presença de inibidores, tais como, Benzamidina 10mM, Aprotinina 10mM, EDTA 10mM, PMSF 10mM, leupeptina 1mM, β -mercaptoetanol 10mM e 1,10-fenantrolina 10mM. Para cada ensaio, inicialmente 5 μ g de TI-Bp foram pré-incubados por 30 min. a temperatura ambiente com o inibidor e em seguida, estas amostras foram incubadas com o fibrinogênio bovino por 1 hora à 37°C. Além disso, a estabilidade da TI-Bp também foi avaliada em diferentes pHs (1 a 11) e temperaturas (-70°C a 100°C), conforme descrito acima.

Em todos os ensaios acima, após a incubação a reação foi interrompida adicionando-se 25 μ L de solução STOP (Tris-HCl 0,06M pH 6,8, SDS 6%, azul de bromofenol 0,001%, glicerol 10% e 10% de β -mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C por 3 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS (PAGE-SDS), como descrito no item 2.3.3.1.

2. 3. 4. 3- Atividade Caseinolítica

A atividade proteolítica sobre a caseína foi realizada preparando uma solução de caseína bovina a 1% (10mg/mL em tampão bicarbonato de amônio 0,1M pH 7,8), sendo esta centrifugada por 15 minutos a 480 X g. O sobrenadante límpido foi separado para o preparo das amostras. Cerca de 10 μ g de proteínas dissolvidas em

solução salina foram incubadas por 30 minutos a 37°C com 50µL de caseína. Para interromper a reação foram adicionados 50% de STOP (Tris-HCl 0,06M pH 6,8, SDS 6%, Azul de Bromofenol 0,001%, Glicerol 10% e 10µL de β-mercaptoetanol 10%) e, em seguida, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 100°C. O teste caseinolítico foi analisado em gel de poliacrilamida com agentes redutores (PAGE-SDS) como descrito no item 2.3.3.1.

2. 3. 4. 4- Atividade esterásica sobre o TAME

A atividade esterásica foi determinada sobre o substrato TAME (N-p-tolueno-sulfonil arginina metil éster) segundo Hummel (1959), com modificações. Neste ensaio 5µg de proteínas foram incubados com uma solução de TAME 1,04µM em Tris-HCl 0,02M, pH 8,1 e KCl 0,15M.

A quantificação da atividade foi realizada por análise espectrofotométrica a 244nm durante os 10 primeiros minutos de reação. Foi definido que uma unidade de atividade esterásica (TAME) representa o aumento na variação de 0,01 de absorbância resultante da atividade hidrolítica da enzima sobre o substrato. A atividade específica foi expressa por unidades de TAME/mg de proteínas.

2. 3. 4. 5- Determinação da atividade procoagulante

A capacidade da TI-Bp de hidrolisar os substratos cromogênicos, S-2238 (H-D-Phe-Pipecolyl-Arg-pNA.2HCl) e S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.2HCl), a 0.1mM, foi realizada utilizando-se diferentes concentrações da enzima diluídas em tampão Tris-HCl 20mM pH 7,4 em um volume final de 100µl. A reação foi realizada durante 20 minutos a 37°C e a hidrólise monitorada por espectrofotometria em absorbância de 405nm, utilizando uma leitora de Microplacas Thermomax (Molecular Devices, Menlo

Park, CA, USA) termostatzada e com agitaçaõ. Neste ensaio determinou-se a concentraçaõ efetiva (CE) da enzima TI-Bp ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) capaz de produzir um aumento de 0,1 de absorvãncia a 405nm durante 10 min. a 37⁰C. Apõs, determinado a CE, os mesmos substratos cromogênicos ditos anteriormente foram utilizados para testar a inibiçaõ da atividade, com os seguintes inibidores de proteases: Benzamidina 150mM, PMSF 2,5mM e EDTA 0,2M.

Outros substratos cromogênicos também foram utilizados para avaliaçaõ da atividade procoagulante da TI-Bp: S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl), S-2765 (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl), S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA.2HCl) e S-2266 (H-D-Val-Leu-Arg-pNA.2HCl). Nestes ensaios, a reaçaõ de hidrólise dos substratos foi avaliada utilizando-se 100 μl de Tris-HCl 20mM pH 7,4, contendo os substratos (0,2mM) e a enzima (CE), conforme descrito acima.

2. 3. 4. 6- Determinaçaõ da funçaõ carboidrato na atividade coagulante da TI-Bp

Para determinar a influência de carboidratos ligados (N-glicanos ou ácido siálico) na atividade "thrombin-like" da TI-Bp, a enzima foi tratada ou não com PNGase-F e neuraminidase, respectivamente. Apõs incubaçãõ por 24 horas a 37⁰C foi avaliada a interferência da cinética da coagulaçaõ. Para isto, 200 μL de plasma humano citratado foram misturados com 50 μL de PBS contendo 125 ou 250ng de TI-Bp tratadas ou não com PNGase-F e neuraminidase, seguindo instruções do fabricante (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA). A reaçaõ foi monitorada por uma leitora de placa ELISA padronizada com absorvãncia a 405nm utilizando um programa cinético.

2. 3. 4. 7- Teste de degradaçaõ da fibrina

Este ensaio foi realizado segundo o método descrito por Leitão e col., (2000), utilizando soluções de fibrinogênio bovino 0,3% e agarose 0,95%, ambas preparadas em tampão barbital 0,05M, pH 7,8, contendo CaCl_2 1,66mM, MgCl_2 0,68mM e NaCl 94mM. Essas soluções foram preparadas com volume final de 10mL e a solução de agarose foi mantida sob aquecimento até a formação de um colóide transparente. Após o esfriamento (40°C) da solução de agarose adicionou-se a solução de fibrinogênio, na proporção (fibrinogênio: agarose, 1:1, v/v). À mistura foi adicionado 100 μL de uma solução contendo trombina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e vertida em placa de Petri para coagulação. As placas contendo coágulo foram mantidas a 4°C e após 30 minutos, com o auxílio de uma ponteira, um número adequado de pequenos orifícios (5mm de diâmetro) foram feitos sobre o coágulo de fibrina para a aplicação das amostras em concentrações desejadas com volume final de 30 μL , seguido de incubação por 24 e 48 horas a 37°C . A análise foi feita visualmente e quantificada com o auxílio de um paquímetro medindo os halos de lises produzidos sobre o coágulo de fibrina.

2.3.4.8- Teste de Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi determinada utilizando o método previamente descrito por Carlini e colegas (1985). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado a partir de sangue citratado coletado a partir da artéria central da orelha de coelhos, transferido imediatamente em tubos contendo 5mM de EDTA (concentração final) e centrifugados a 375g por 12 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, amostras do PRP obtidas foram centrifugados a 1800g por 2 minutos também à temperatura ambiente e os "pellets" de plaquetas foram ressuspensos em uma solução de Tyrode-gelatina (TG) com pH final ajustado à 7.4, para obter plaquetas lavadas. A suspensão foi ajustada para uma concentração de $3-4 \times 10^5$ células/ μL .

A agregação plaquetária foi medida turbidimetricamente utilizando um agregômetro Whole Blood Lumi-Agregometer (Chrono Log Corporation. Havertown,

EUA). O método foi realizado em cuvetas de vidro siliconizadas com volume total de 240 μ L. Plaquetas lavadas (4×10^5 células/ μ L) ressuspendidas em Tampão TG (200 μ L) com 1mM de CaCl₂ (concentração final) foram agitadas à 37°C com várias concentrações de TI-Bp (5-40 μ g/mL) por 2 minutos. Em seguida, o fibrinogênio (0,5mg/mL) foi adicionado e agregação plaquetária foi monitorada. O controle experimental foi realizado sem a presença de fibrinogênio. A máxima agregação plaquetária tida como 100% foi obtida com concentração supramáxima de 2nM de trombina e comparadas com a agregação induzida pela TI-Bp, enquanto que 0% de agregação (linha de base) foi a transmitância registrada em presença de plaquetas lavadas isoladamente ou após a adição de tampão TG. Os resultados foram expressos com média \pm SEM de dois experimentos individuais (n=4).

2. 3. 5- Atividades Biológicas

2. 3. 5. 1- Atividade edematogênica

Grupos de 5 camundongos (18-22g) foram injetados intradermicamente na região subplatar da pata direita com 50 μ l de solução contendo 25 μ g peçonha bruta ou TI-Bp dissolvidas em PBS. Em seguida realizava-se a medição das patas em diferentes intervalos (30', 1, 2, 3 horas) de tempo a partir do tempo 0h (o qual era subtraído e cada valor obtido). O aumento da área na pata dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão 0,01mm (Mytutoyo, Japão) e expresso em porcentagem direta de edema induzido.

2. 3. 5. 2- Análise miotóxica por dosagem de creatina cinase no plasma

Aproximadamente 50 μ g da enzima TI-Bp foram inoculados no músculo gastrocnemius direito de camundongos machos Swiss (n=3, 18-22g). Após 3 horas

os animais foram sacrificados e o sangue colhido por punção cardíaca e imediatamente centrifugados a 2.500 X g por 10 minutos a 4^oC (Laborzentrifugem 2K 15-Sigma). Os animais controles receberam somente PBS no mesmo volume que a toxina. A atividade da enzima creatina cinase foi determinada utilizando-se o Kit CK-UV cinético (Bioclin). A atividade creatina cinase foi expressa em unidades/litro, constituindo uma unidade o resultado da fosforilação de um nanomol de creatina por minuto a 25^oC.

2. 3. 5. 3- Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica foi realizada como descrito por Nikai e col., (1984), com algumas modificações. Foram utilizados camundongos Swiss machos de 20-25g divididos em grupos (n=5). Os animais controle receberam injeção intradérmica de 50µL de PBS e os outros grupos receberam 50 ou 100 µg TI-BP, dissolvidos em 50µL de PBS. Após 3 horas de inoculação, os animais foram sacrificados, a pele removida e o halo hemorrágico na superfície interna da pele foi medido com um paquímetro digital DIGMESS 100.174BL.

2. 3. 5. 4- Ensaio de incoagulabilidade sanguínea

O ensaio de desfibrinogenação do plasma foi realizado utilizando camundongos da raça Swiss, machos, de pesos que variavam de 40-50g, separados em oito grupos (n=3), dos quais, receberam por via intraperitoneal doses variáveis da toxina isolada TI-Bp. Os grupos foram separados de acordo com as seguintes doses de TI-Bp/Kg animal: 1mg/Kg; 0,5mg/Kg; 0,25mg/Kg; 0,125mg/Kg; 0,1mg/Kg; 0,0625mg/Kg; 0,05mg/Kg e 0,125mg/Kg, para determinar a dose mínima capaz de tornar o sangue dos animais incoagulável. Como controle negativo, animais receberam por via intraperitoneal 50µL de PBS.

Após 6 horas os animais foram anestesiados com éter de petróleo, o sangue esgotado por punção cardíaca na ausência de anticoagulante, em seguida depositado imediatamente em tubo de vidro e o tempo gasto para formar um coágulo de fibrina visível foi cronometrado.

2. 3. 6- Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o Programa InStat Plus versão 3.36. Os resultados foram apresentados por uma média de 3 experimentos e desvio padrão. Significâncias estatísticas dos resultados foram determinadas utilizando teste t-Student's. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

2. 4- Resultados

2. 4. 1- Isolamento e caracterização química

O fracionamento da peçonha de *Bothrops pauloensis* foi inicialmente realizado em resina CM-Sepharose. A peçonha total foi resolvida em cinco frações denominadas CM1 a CM5 (Figura 1A). Todas as frações foram ensaiadas para verificar a presença de atividade coagulante e esterásica, no entanto somente a fração CM4 apresentou atividade de forma significativa.

A fração CM4, depois de liofilizada foi submetida em resina de afinidade Phenyl-Sepharose CL-4B obtendo-se sete frações denominadas P1 a P7 (Figura 1B). A fração P4 apresentou excelente atividade coagulante “*in vitro*” e esterásica sobre o TAME e foi separada para a realização de atividades biológicas e enzimáticas. Os ensaios de critérios de pureza dessa fração são apresentados na figura 1 C, D e E. A fração P4 apresentou um único pico de ABS a 280nm em HPLC-RP (Figura 1C), bem como única banda em SDS-PAGE sob condições redutoras e

não redutoras (Figura 1 D) com uma massa molecular de 34 kDa e pI de aproximadamente 6,4 (Figura 1 E).

Para investigar a presença de carboidratos na estrutura da enzima, a TI-Bp foi tratada com neuraminidase ou PNGase F. Neuraminidase remove resíduos de ácido siálico de domínios carboidratos e PNGase F é uma amidase que atua clivando entre os resíduos de asparagina e GlcNAc de glicoproteínas N-ligadas. As análises por PAGE-SDS em condições redutoras revelaram que TI-Bp diminuiu sua massa molecular aparente para 30 e 25kDa, respectivamente, indicando que a molécula contém ácido siálico e N-glicanos na sua estrutura (resultados não apresentados).

Na tabela I está representada a recuperação protéica pelo método de Bradford, dos passos de purificação da TI-Bp obtida a partir do fracionamento da peçonha de *Bothrops pauloensis* em CM-Sepharose e Phenyl-Sepharose CL-4B. Como pode ser observada, a fração P4 (TI-Bp) resultante do segundo passo de purificação apresentou cerca de 3% de rendimento protéico. A recuperação das atividades coagulante e esterásica foi de aproximadamente 12% (769U/mg) e 8,3% (5580U/mg) respectivamente.

A seqüência dos 15 primeiros resíduos da região N- terminal está mostrado na Tabela II. O alinhamento da seqüência da TI-Bp com outras SVTLEs mostra alta similaridade.

2. 4. 2- Características Funcionais

A enzima TI-Bp apresentou atividade coagulante sobre o plasma bovino, com Dose Mínima Coagulante de 1,3µg. A atividade manteve-se estável depois da pré-incubação da enzima em pHs entre 3 e 9 (Figura 2A), e temperaturas de -70 a 37⁰C (Figura 2B). A atividade coagulante foi inibida por benzamidina, leupeptina e PMSF (Figura 2C). De todos os íons divalentes testados somente Cu⁺⁺ (10mM) foi capaz de

inibir eficientemente a ação coagulante da enzima TI-Bp (Figura 2D) (Tukey's, $P < 0,05$).

A clivagem do fibrinogênio bovino pela TI-Bp em concentração e tempo-dependente está mostrada na figura 3A e B, respectivamente. Os resultados em SDS-PAGE indicam que a cadeia A- α desapareceu nos primeiros cinco minutos de incubação da TI-Bp com o fibrinogênio. Enquanto que a cadeia B- β foi consumida apenas parcialmente em tempos maiores. Nossos resultados demonstram que o fibrinogênio não sofre alterações depois de 1 hora de incubação e que 5 μg são suficientes para hidrolisar a cadeia A- α do fibrinogênio, sendo observado que a cadeia γ não foi degradada nestas condições experimentais.

Estudos de estabilidade enzimática demonstraram que a enzima isolada TI-Bp apresentou atividade sobre o fibrinogênio quando incubada em diferentes pHs e temperaturas inferiores a 37 $^{\circ}\text{C}$ (Figuras 3C e D).

O efeito de agentes inibidores sobre a atividade proteolítica de TI-Bp pode ser observado na figura 3E. Dentre os inibidores testados, a Benzamidina e PMSF foram capazes de inibir satisfatoriamente a degradação da cadeia A- α do fibrinogênio.

O resultado obtido para a atividade caseinolítica da peçonha bruta e da TI-Bp está apresentado na Figura 4. Pode-se observar pela análise eletroforética que as cadeias da caseína foram digeridas somente pela peçonha bruta e fração CM4, após 30 minutos de incubação. No entanto, a TI-Bp não mostrou atividade proteolítica sobre este substrato nas condições experimentais utilizadas.

TI-Bp catalisou a hidrólise dose-dependente dos substratos cromogênicos S-2288 e S-2238 os quais são específicos para serinoproteases e enzimas "thrombin-like", respectivamente (Figura 5A), apresentando uma concentração efetiva (CE) de 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tukey, $p < 0,05$).

Ensaio de inibição enzimática demonstraram que o EDTA não foi capaz de inibir a atividade proteolítica sobre esses substratos (Tukey, $p < 0,05$), já o PMSF inibiu parcialmente esta atividade e a benzamidina inibiu completamente a ação da enzima (Figura 5B).

TI-Bp também mostrou atividade caliceína-like e procoagulante, hidrolisando diferentes substratos cromogênicos, como S-2302 para caliceína plasmática, fator XIa e XIIa e S-2266 para caliceína glandular e fator XIa. TI-Bp, por sua vez, não atuou sobre o substrato S-2765, o qual é específico para o fator X e não mostrou alguma atividade sobre a plasmina, já que a enzima não foi capaz de hidrolisar o substrato S-2251 (Figura 5C). Além disso, estudos “*in vitro*” da atividade fibrinolítica mostraram que a TI-Bp não foi capaz de degradar o coágulo de fibrina formado em placa de petri com soluções de fibrinogênio e trombina (resultados não apresentados).

Para investigar se a presença de carboidratos ligados a estrutura da enzima interfere na sua atividade catalítica, TI-Bp foi tratada com PNGase-F e neuraminidase. A cinética da reação é apresentada na Figura 6. Utilizando a PNGase-F a qual remove carboidratos N-ligados, foi observada uma pequena diferença significativa na diminuição da atividade coagulante (Teste t- Student’s, $p > 0,05$). No entanto, a enzima TI-Bp quando tratada com neuraminidase não diminuiu a atividade coagulante da enzima (Figura 6B), mostrando que a remoção de ácido siálico não interferiu na sua atividade catalítica (Teste t- Student’s, $p < 0,05$).

A enzima TI-Bp quando injetada intraperitonealmente em camundongos tornou o sangue incoagulável, límpido e sem aspecto viscoso apresentando dose mínima incoagulante de 0,05mg/Kg.

TI-Bp foi capaz de induzir agregação plaquetária de plaquetas lavadas de maneira dependente apenas na presença de fibrinogênio humano exógeno (Figura 7, círculos fechados). Em contrapartida, TI-Bp não demonstrou efeito sobre as plaquetas em ausência da adição de fibrinogênio (Figura 7, círculos abertos). Portanto, TI-Bp sozinha não induz agregação plaquetária.

Esta enzima não apresentou atividade hemorrágica, miotóxica e mostrou moderado efeito edematogênico quando comparada com a peçonha de *Bothrops pauloensis* (resultados não apresentados).

2. 5- Discussão e Conclusões

No presente trabalho, apresentamos métodos eficientes e relativamente simples de isolar uma serinoprotease “thrombin-like” com alto grau de pureza da peçonha de *Bothrops pauloensis*, denominada TI-Bp.

TI-Bp foi isolada a partir de uma combinação de cromatografias de troca iônica e afinidade. A enzima representa aproximadamente 3% das proteínas totais da peçonha, consiste de cadeia polipeptídica única com massa molecular de 34kDa (estimado com agente redutor), ponto isoelétrico de 6,4 e contém carboidratos N-ligados e ácido siálico na sua estrutura. As enzimas “thrombin-like” purificadas de diferentes peçonhas de serpentes são proteínas de cadeia única e com massas moleculares que podem variar de 26 a 67kDa. As diferentes massas moleculares para essas enzimas podem ser atribuídas aos conteúdos de carboidratos que cada enzima contém (SERRANO; MAROUN, 2005) e os níveis de glicosilação são responsáveis pela microheterogenidade encontradas nas diversas SVTLEs.

A importância do domínio carboidrato na relação estrutura-função de SVTLEs não é bem entendido. Em muitos casos, foi demonstrado que a N-glicosilação interfere na atividade catalítica destas enzimas. No entanto, Komori e Nikai (1998) relataram que em outras serinoproteases, carboidratos são mais importantes para a estabilização da proteína do que para a atividade catalítica. Nossos resultados demonstram que a remoção de ácido siálico da TI-Bp não alterou as propriedades cinéticas de coagulação, mas a clivagem de N-glicanos diminuiu a eficiência catalítica da enzima.

A estrutura primária da TI-Bp determinada por métodos de seqüenciamento automatizado, mostrou 100% de similaridade da região N-terminal com outras enzimas “thrombin-like” como batroxobina (STOCKER et al., 1976), flavoxobina (SHIEH et al., 1988) e bothrombina (NISHIDA et al., 1994) quando analisado os primeiros quinze resíduos de aminoácidos, sugerindo uma ancestralidade molecular comum. Essa alta homologia entre as enzimas coagulantes é confirmada pela

presença de valina como primeiro resíduo N-terminal, característica esta comum na maioria das SVTLEs (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 1997).

Algumas propriedades fisiológicas e bioquímicas como atividade coagulante, especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio, ação sobre os fatores ativadores da coagulação sanguínea e efeito de inibidores (MATSUI et al.; 2000; CASTRO et al., 2004; SERRANO; MAROUN, 2005) são variáveis nas SVTLEs isoladas de serpentes pertencentes a diferentes gêneros como, *Agkistrodon*, *Cerastes*, *Trimeresurus*, *Bitis*, *Lachesis* e *Bothrops* (PIRKLE, 1998).

TI-Bp mostrou atividade esterásica sobre o TAME, coagulante “*in vitro*” sobre o plasma bovino citratado e sobre o fibrinogênio bovino, no entanto não demonstrou alguma atividade proteolítica sobre a caseína, já que este não representa um substrato natural para a ação de toxinas de serpentes.

Estudos de estabilidade da enzima isolada sobre as atividades coagulante e fibrinogenolítica demonstraram que a TI-Bp mantém suas propriedades coagulantes em várias faixas de pHs e temperaturas e presença de diversos inibidores e cátions divalentes. Esses resultados confirmam uma característica distinta de SVSPs na resistência à inativação por pH e calor extremos, isso provavelmente devido a presença de carboidratos ligados covalentemente na proteína que são capazes de evitar a desnaturação (SWENSON; MARKLAND JÚNIOR., 2005).

Os ensaios de hidrólise das cadeias do fibrinogênio pela TI-Bp demonstraram que a cadeia A- α foi preferencialmente degradada. Este padrão de hidrólise é comum em outras enzimas coagulantes isoladas de peçonhas ofídicas. Portanto, nossos resultados sugerem que a TI-Bp pertence ao grupo SVTLE-A (CASTRO et al., 2004), por apresentar esta especificidade de catálise sobre o fibrinogênio.

A maioria das serinoproteases atua em diversos substratos naturais e sintéticos e suas propriedades enzimáticas são geralmente afetadas por inibidores específicos tais como PMSF, leupeptina, aprotinina e benzamidina (BRAUD et al., 2000; SERRANO; MAROUN, 2005).

A susceptibilidade dos inibidores de proteases sobre a TI-Bp usando fibrinogênio como substrato, mostraram que o PMSF e Benzamidina foram capazes

de inibir a ação da enzima. Estes inibidores são típicos de serinoproteases e atuam a partir de mecanismos capazes de bloquearem o sítio ativo da enzima.

TI-Bp catalisou a hidrólise dos substratos cromogênicos S-2288 e S-2238, demonstrando que a enzima é uma serinoprotease pertencente à subclasse das enzimas “thrombin-like”. Benzamidina inibiu eficientemente a atividade da enzima por ambos os substratos, em contraste para uma inibição parcial quando o PMSF foi utilizado. Esses peptídeos H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.2HCl (S-2288) e H-D-Phe-Pipecolyl-Arg-pNA.2HCl (S-2238) foram os substratos mais susceptíveis para hidrólise pela TI-Bp, pois o centro ativo da enzima tem uma natureza aniônica que exige alta especificidade e preferências por aminoácidos como a arginina. Essa observação é confirmada pela especificidade enzimática em clivar ligações Arg-Gly na cadeia A- α do fibrinogênio. Esse comportamento é bastante comum em outras enzimas “thrombin-like” já estudadas (SILVA JÚNIOR; DE-SIMONE, 2004; MAGALHÃES et al., 2006).

A atividade hidrolítica de TI-Bp sobre os peptídeos cromogênicos S-2266 e S-2302 sugere que esta enzima possui uma atividade caliceína-like, assim como algumas toxinas isoladas de outras peçonhas, a saber: a Crotalase isolada de *Crotalus adamanteus* (MARKLAND; DAMUS, 1971) mostrou alta eficiência catalítica para ambos os substratos da caliceína, comparado com a trombina. Em adição, crotalase possui atividade liberação de cinina, uma evidência adicional de similaridades entre a caliceína e crotalase. Batroxobina isolada de *Bothrops moojeni* (STOCKER et al., 1976) também mostrou propriedades caliceína-like com aplicação de diferentes metodologias. Esses dados sugerem que SVTLEs divergiram da caliceína glandular e que, ao longo da evolução foram alteradas adquirindo diversas funções fisiológicas (ITOH et al., 1988). Portanto, TI-Bp possui alta especificidade para substratos caliceína, embora não determinamos alguma atividade de liberação de cinina sobre o plasma sanguíneo associados com a enzima purificada. Enzimas com propriedades caliceína-like têm sido isoladas de várias peçonhas da família Viperidae e são responsáveis por provocarem após o envenenamento, dor local,

aumento da permeabilidade capilar, hipotensão sistêmica e contração do músculo liso (WEINBERG et al., 2004).

O estudo do mecanismo de ação de enzimas “thrombin-like” tem revelado que, apesar de todas as SVSPs terem em comum a geometria do sítio ativo e o mecanismo enzimático, elas podem exibir uma diversidade de funções biológicas. Estudos adicionais provavelmente contribuem para elucidação e maior entendimento da relação estrutura-função de serinoproteases.

A enzima TI-Bp não apresentou atividade fibrinolítica, uma vez que não foi capaz de hidrolisar o substrato da plasmina (S-2251) e também não degradou o coágulo de fibrina. Por outro lado, TI-Bp foi capaz de tornar o plasma de camundongos incoagulável, provavelmente por consumir totalmente o estoque de fibrinogênio, quando injetada intraperitonealmente. Os resultados sugerem que a enzima estudada atua consumindo o estoque de fibrinogênio embora a quantificação deste não tenha sido realizada.

SVSPs geralmente não são capazes de ativar o fator XIII da cascata de coagulação, portanto favorecem a fibrinólise causando incoagulabilidade “*in vivo*”. Assim, por levarem a uma rápida diminuição do fibrinogênio, causam efeitos anticoagulantes, diminuindo a viscosidade do sangue. Essas enzimas, principalmente as “thrombin-like” são extensamente exploradas como reagentes de diagnóstico, drogas hemostáticas e agentes desfibrinogénantes, para o tratamento e prevenções de disfunções cardiovasculares e trombozes (FURUKAWA; ISHIMARA, 1990; BRAUD et al.; 2000; HENRIQUES et al., 2004).

TI-Bp não induziu agregação plaquetária, miotoxicidade, hemorragia e não formou edemas pronunciados. Portanto, sugerimos que esta proteína possua baixa toxicidade quando analisada isoladamente, mas quando associada à peçonha pode contribuir para sua letalidade devido a sua alta atividade proteolítica.

Analisados em conjunto, nossos resultados demonstram que a TI-Bp é uma nova isoforma “thrombin-like” que apresenta características promissoras que evidenciam futuras possibilidades de seu uso clínico.

2. 6- Referências bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic. Acids. Res.**, v.25, p.3389-3402, 1990.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SAMPAIO, S. V.; CUNHA, O. A. B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom. **Toxicon**, v.35, n.7, p.1043-1052, 1997.

ARAÚJO, M. S.; MARTINS, M. The defensive strike of five species of lanceheads of the genus *Bothrops* (Viperidae). **Braz. J. Biol.**, v.67(2), p.327-332, 2007.

ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAU, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Compedium Biochemistry and Physiology**, n.102, p.727-732, 1992.

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

BRASIL, M. S. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ed., Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v.82, p.851-859, 2000.

CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; RIBEIRO, J. M. C. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of platelet lipoxigenase pathway. **Br. J. Pharmacol.**, v.84, p.551-560, 1985.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, p.843-856, 2004.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Europ. J. Biochem.**, v.1, p.80-91, 1967.

FURUKAWA, K.; ISHIMARA, S. Use of thrombin-like snake venom enzymes in the treatment of vascular occlusive discases. In: STOCKER, K. F. (Ed.). **Medical use of snake venom proteins**. CRC Press: Boca Raton. 1990. p.161-199.

HALFON, S.; CRAIK, C. S. Introduction: serine peptidases and their clans. In: BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. (Eds) **Handbook of Proteolytic Enzymes Academic Press**. 1998. p.3-4.

HENRIQUES, E. S.; FONSECA, N.; RAMOS, M. J. On the modeling of snake venom proteinase interactions with benzamidine-based thrombin inhibitors. **Protein Science**, v.13, p.2355-2369, 2004.

HUMMEL, B. C. A modified spectrophotometric determination of chimotrypsin, tripsin and thrombin. **J. Biochem. Physiol.**, v.37, p.1393-1399, 1959.

INSTAT PLUS. **An interactive statistical package, version 3.36**. University of Reading, United Kingdom. Disponível em: <<http://www.reading.ac.uk/software/instat>>.

ITOH, N.; TANAKA, N.; FUNAKOSHI, I.; KAWASAKI, T.; MIHASHI, S.; YAMASHIMA, I. Organization of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. Homology with the trypsin/kallikrein gene family. **Journal Biological Chemistry**, v.263, p.7628-7631, 1988.

KOMORI, Y.; NIKAI, T. Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzyme from snake venoms. **J. Toxicol., Toxin Rev.**, v.17, p.261-277, 1998.

KORNALIK, F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. **Pharmac. Ther.**, v.29, p.353-405, 1985.

KORNALIK, F. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: SHIER W. T.; MEBS, D. (Eds). **Handbook of Toxicology**, v.18. New York : Marcel Dekker, 1990. p.697-709.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-689, 1970.

LEITÃO, D. P. S.; POLIZELLO, A. C. M.; ROTHSCHILD, Z. Coagulation and fibrinolysis in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), a close relative of the guinea-pig (*Cavia porcellus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.125, p.113-120, 2000.

LESK, A. M.; FORDHAM, W. D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Journal Molecular Biology**, v.258, p.501-537, 1996.

MAGALHÃES, H. P.B.; MAGALHÃES, A.; JULIANO, L.; NELSON, D. L.; ROGANA, E. Mechanism of action and determination of the best substrate for a thrombin-like enzyme from *Lachesis muta muta* venom by regression analysis of the kinetic parameters determined with peptidyl *p*-nitroanilide substrates. **Toxicon**, v.47, p-453-458, 2006.

MARKLAND, F. S.; DAMUS, P. S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus*. **J. Biol. Chem.**, v.246, p.6460-6473, 1971.

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

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v.45, p.1171-1181, 2005.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1477, p.146-156, 2000.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxic from the venom of *Crotalus atrox*. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.231, p.309-311, 1984.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZEKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v.33, p.1843-1849, 1994.

NOLAN, C.; HALL, L. S.; BARLOW, G. H. Ancrod, the coagulation enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. In: LORAND, L. (Ed.). **Methods in Enzymology**, v.45. New York: Academic Press, 1976. p.205-214.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272(48), p.29987-29990, 1997.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.47(1), p.24-29, 2001.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thromb. Haemost.**, v.79, p.675-683, 1998.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a non hemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake venom. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.381, p.213-224. 2000.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. (Eds). **Venomous and Their Venoms 2**. New York: Academic Press, 1971. p.345.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v.45, p.1115-1132, 2005.

SHIEH, T. -C.; KAWABATA, S. I.; KIHARA, H.; OHNO, M.; IWANAGA, S. Amino acid sequence of a coagulant enzyme, flavoxobin, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **Journal Biochemistry**, v.103, p.596-605, 1988.

SILVA JR., F.P.; DE-SIMONE, S. G. S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.12, p.2571-2587, 2004.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (bathroxobin). In: LORAND, L. (Ed.). **Methods of Enzymology**, v.45B. New York: Academic Press, 1976. p.214.

STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, v.20, p.265-273, 1982.

SWENSON, S.; MARKLAND JR, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v.45, p.1021-1039, 2005.

VESTEBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. **Biochem. Biophys. Acta**, v.257, p.11-13, 1972.

WEINBERG, M. L. D.; FELICORI, L. F.; BELLO, A. B.; MAGALHÃES, H. P. B.; ALMEIDA, A. P.; MAGALHÃES, A.; SANCHEZ, E. F. Biochemical properties of a Bushmaster snake venom serine proteinase (LV-Ka), and its kinin releasing activity evaluated in rat mesenteric arterial rings. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.96, p.333-342, 2004.

WHITE, J. Snake venom and coagulopathy. **Toxicon**, v.45, p.951-967, 2005.

ZHANG, Y.; WISNER, A.; XIONG, Y.; BON, C. A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. **Journal Biological Chemistry**, v.270, p.10246-10255, 1995.

Tabela I: Rendimento protéico e atividades enzimáticas da TI-Bp isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*.

Amostras	Proteínas		Atividades enzimáticas					
	mg (totais)	Recuperação (%)	Atividade coagulante			Atividade esterásica TAME		
			Atividade total (U [*])	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Atividade total (U [†])	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Peçonha bruta[‡]	122	100	24400	200	1	256810	2105	1
CM-Sepharose[§]	9,3	7,6	3100	333	1,7	28179	3030	1,5
Phenyl-Sepharose CL-4B[¶]	3,8	3,1	2923	769	3,9	21204	5580	2,7

* 1U= quantidade de enzima que coagula 150µL de plasma bovino citratado a 37^oC durante 60 segundos, definida como Dose Mínima Coagulante (DMC).

DMC das amostras: [‡]5.0µg; [§]3.0µg; [¶]1.3µg que coagula 150µL de plasma bovino a 37^oC durante 60 segundos.

[†]1U= representa o aumento na variação de 0,01 de absorbância (244nm) que a enzima hidrolisa o substrato (TAME).

Tabela II: Homologia da seqüência N-terminal entre a TL-Bp e outras enzimas “Thrombin-like”.

Enzimas	Serpente	Seqüência N- terminal	Referências
TI-Bp	<i>Bothrops pauloensis</i>	VIGGDECDINEHPFL	Presente trabalho
Bothrombina	<i>Bothrops jararaca</i>	VIGGDECDINEHPFL	NISHIDA et al.; 1994
Batroxobina	<i>Bothrops moojeni</i>	VIGGDECDINEHPFL	STOCKER et al; 1976
Flavoxobina	<i>Trimeresurus flavoridis</i>	VIGGDECNINEHPFL	SHIEH et al; 1988
Crotalase	<i>Crotalus adamanteus</i>	VIGGDECNINEHRFL	MARKLAND et al; 1971
Ancrod	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	VIGGDECNINEHRFL	NOLAN et al, 1976
TSV-PA	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	VFGGDECNINEHRSL	ZHANG et al.; 1995

Nota: Resíduos de aminoácidos conservados são mostrados em amarelo

Legenda de Figuras

Figure 1. Passos da purificação sequencial da TI-Bp (A): Cromatografia de 200mg da peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis* em coluna de CM-Sepharose equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas em bicarbonato de amônia (0,05-0,5M), num fluxo de 20mL/h a temperatura ambiente. Frações de 3mL foram coletadas. **(B)** Recromatografia de 10 mg da fração CM4 em Phenyl-Sepharose CL-4B (2.0x20.0cm) previamente equilibrada com Tris-HCl 10mM pH 8,5 + NaCl 4M. A eluição foi realizada com Tris-HCl 10mM em concentrações molares decrescentes de NaCl finalizando com água destilada. O fluxo foi de 20mL/h a temperatura ambiente. Frações de 2,5mL foram coletadas. **(C)** Cromatografia em HPLC-RP da fração P4 em coluna Shimadzu C8. 1mg da fração foi dissolvido em 550µL de ácido trifluoracético 0,1% (v/v). A amostra foi eluída com gradiente linear de acetonitrila 70% (v/v). O pico foi eluído com fluxo de 1mL/min e absorbância monitorada a 280nm. **(D)** SDS-PAGE (14%) da TI-Bp purificada. (PM) Marcador de Peso molecular; (1) TI-Bp reduzida (2) TI-Bp não reduzida. **(E)** pI

Figura 2: Atividade coagulante sobre o plasma bovino citratado Como controle, foi utilizado 1,3µg de TI-Bp em Tris-HCl 10mM, pH 7,4 à temperatura ambiente. **(A)** Efeito do pH; **(B)** Efeito da temperatura; **(C)** Efeito de inibidores; **(D)** Efeito de íons divalentes. **Nota:** Barras representam a média de 3 experimentos com desvio padrão e *(p < 0,05) representa significância comparado com TI-Bp (controle).

Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada por diferentes condições experimentais. **(A) Dose dependente de TI-Bp:** Diferentes concentrações da enzima foram incubadas com 50µL de fibrinogênio bovino a (1,5mg/mL) a 37°C por 1 hora. 1- fibrinogênio bovino controle; 2- 0.1µg; 3- 0.5µg; 4- 1µg; 5- 3µg; 6- 5µg; 7- 10µg.; **(B) Tempo dependente:** 5 µg de TI-Bp incubados com 50µL de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL) a 37°C. 1- fibrinogênio bovino controle; 2- 5'; 3- 15'; 4- 30'; 5- 45'; 6- 1h; 7- 2h; **(C) Variação do pH:** 5µg TI-Bp incubados com 50µL de fibrinogênio bovino

(1,5mg/mL) a 37°C por 1 hora. 1- fibrinogênio bovino controle; 2- pH 1,0; 3- pH 3,0; 4- pH 5,0; 5- pH 7,0; 6- pH 9,0; 7- pH 11,0; **(D) Variação de temperatura:** 5µg TI-Bp incubados com 50µL de fibrinogênio bovino (1,5mg/mL) por 1 hora. 1- TI-Bp; 2- 70°C; 3- -20°C; 4- 4°C; 5- 25°C; 6- 37°C; 7- 60°C; 8- 100°C; 9- fibrinogênio bovino controle. **(E) Presença de EDTA e inibidores de proteases:** 5µg TI-Bp incubados com 50µL de fibrinogênio bovino (1,5mg/mL) a 37°C por 1 hora. 1- fibrinogênio bovino controle; 2- Controle positivo (fibrinogênio + TI-Bp); 3- EDTA; 4- PMSF; 5- β-mercaptoetanol; 6- Benzamidina; 7- Aprotinina; 8- Leupeptina; 9- 1,10-fenantrolina.

Figura 4: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise da caseína bovina, causada pela peçonha bruta (5µg) e frações (5µg). 1- caseína bovina controle; 2- peçonha bruta; 3- CM4; 4- TI-Bp.

Figura 5: Determinação da atividade proteolítica de TI-Bp sobre diferentes substratos cromogênicos, preparados a 0,1mM. **(A)** Atividade proteolítica dose-dependente da enzima TI-Bp (2µg, 5µg, 10µg e 20µg) sobre os substratos cromogênicos S-2288 e S-2238, respectivamente a 37°C. **(B)** Inibição da atividade proteolítica da TI-Bp, utilizando a concentração efetiva da enzima sobre os substratos cromogênicos S-2288 e S-2238, respectivamente induzida por inibidores como, PMSF 2,5mM, benzamidina 150mM e EDTA 0,2M. **(C)** Determinação da atividade procoagulante caliceína-like da TI-Bp (0,05µg/µL) através da hidrólise de substratos a 0,2mM, S-2302, S-2266, S-2765 e S-2251. As reações foram monitoradas pela absorbância a 405nm.

Figura 6: Método cinético de determinação da função carboidrato na atividade procoagulante de TI-Bp. A enzima nativa digerida enzimaticamente com PNGase-F ou neuraminidase, foi incubada com plasma humano citratado e analisada em leitora de placa ELISA. **(A)** TI-Bp tratada ou não com PNGase-F; **(B)** TI-Bp tratada ou não com neuraminidase.

Figura 7: Concentração-dependente da agregação plaquetária induzida por TI-Bp. Plaquetas lavadas de coelhos (4×10^5 células/ μL) foram agitadas à 37°C com várias concentrações de TI-Bp (5-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 2 minutos. A agregação plaquetária foi avaliada na presença de fibrinogênio (círculos fechados) e na ausência de fibrinogênio (círculos abertos). A máxima agregação plaquetária, tida como 100% foi obtida com concentração supramáxima de 2nM de trombina e comparada com a agregação induzida por TI-Bp, enquanto que 0% de agregação (linha de base) foi obtida com plaquetas lavadas sozinhas ou após adição de tampão Tyrode.

Figura 2

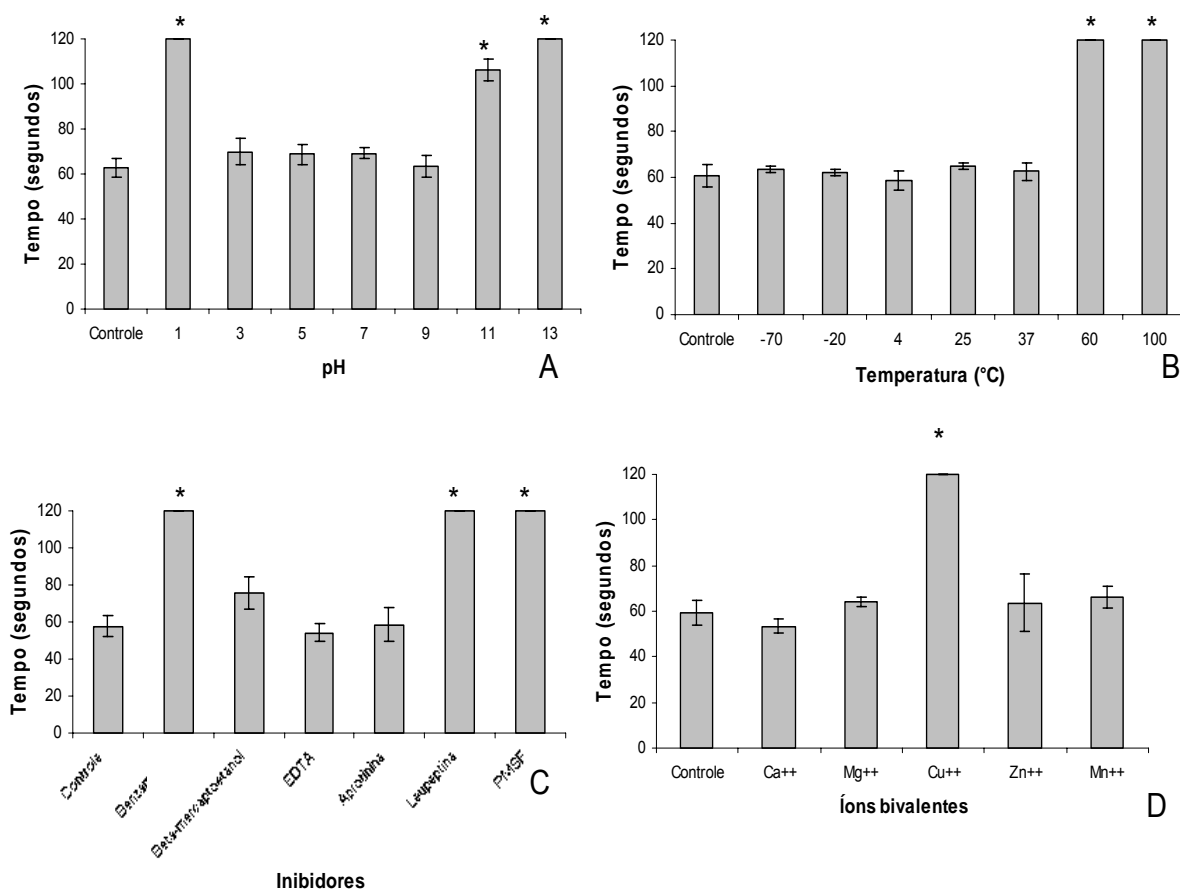


Figura 5

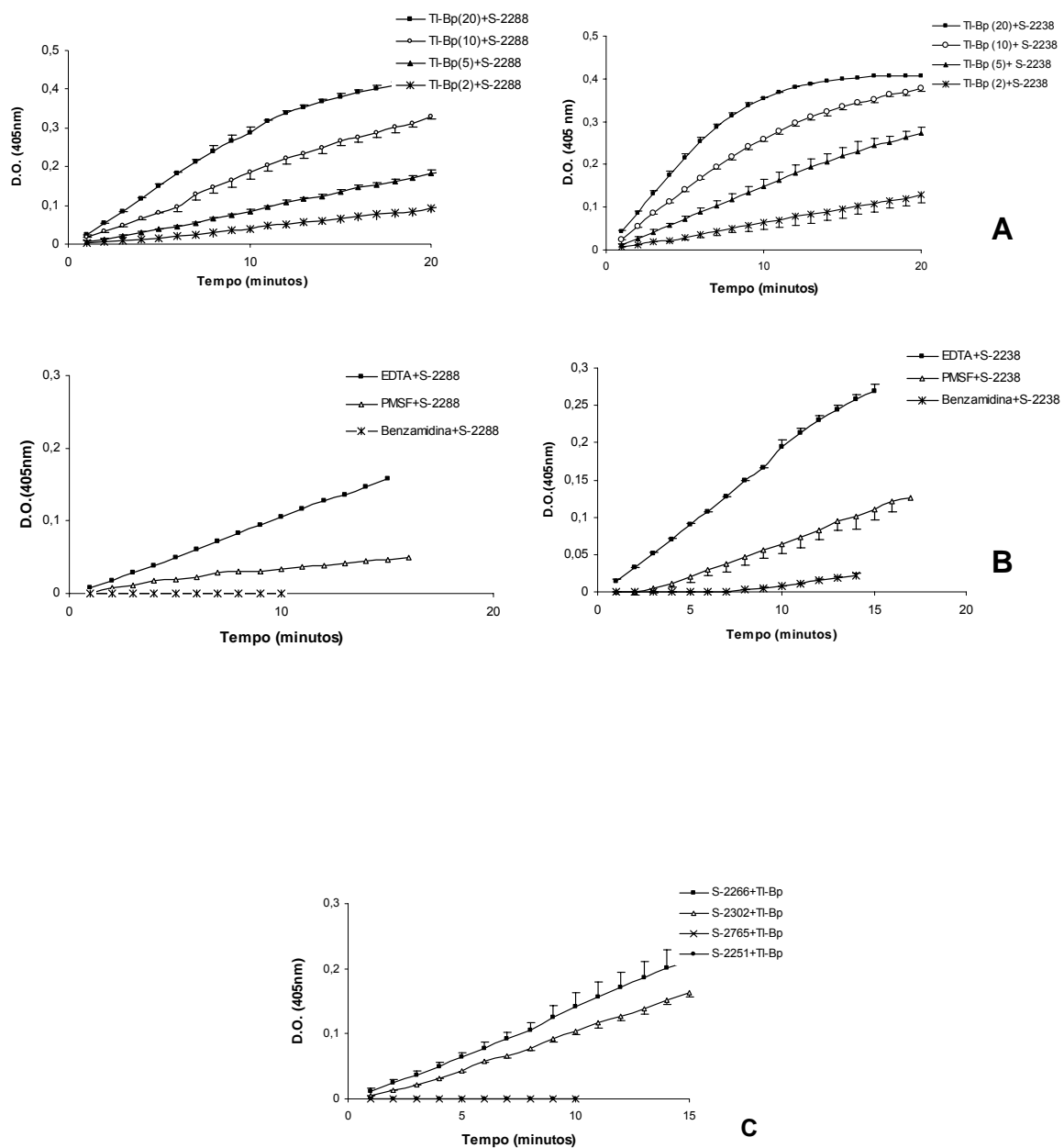


Figura 7

