



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós Graduação em Genética e Bioquímica

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA MOOZINCINA,
UMA METALOPROTEASE DEPENDENTE DE ZINCO PRESENTE NA
PEÇONHA DA SERPENTE *BOTHROPS MOOJENI* (CAIÇACA)**

Estudante: **Kelly Cortes Fonseca**
Orientador: **Nilson Penha-Silva**
Co-orientador: **Fábio de Oliveira**

Uberlândia, MG
2010



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós Graduação em Genética e Bioquímica

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA MOOZINCINA,
UMA METALOPROTEASE DEPENDENTE DE ZINCO PRESENTE NA
PEÇONHA DA SERPENTE *BOTHROPS MOOJENI* (CAIÇACA)**

Estudante: **Kelly Cortes Fonseca**
Orientador: **Nilson Penha-Silva**
Co-orientador: **Fábio de Oliveira**

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

Uberlândia, MG
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- F676p Fonseca, Kelly Cortes, 1985-
Purificação e caracterização bioquímica da moozincina, uma metaloprotease dependente de zinco presente na peçonha da serpente *Bothrops Moojeni* (Caiçaca) [manuscrito] / Kelly Cortes Fonseca. - 2010.
51 f. : il.
- Orientador.: Nilson Penha-Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 2. Bothrops - Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 615.99:598.126



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós Graduação em Genética e Bioquímica

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA MOOZINCINA,
UMA METALOPROTEASE DEPENDENTE DE ZINCO PRESENTE NA
PEÇONHA DA SERPENTE *BOTHROPS MOOJENI* (CAIÇACA)**

Estudante: **Kelly Cortes Fonseca**
Orientador: **Nilson Penha-Silva**
Co-orientador: **Fábio de Oliveira**

Comissão Examinadora

Presidente: Professor Dr. **Nilson Penha-Silva** (Orientador) [UFU]
Examinador: Professora Dra. **Veridiana de Melo Rodrigues Ávila** [UFU]
Examinador: Professor Dr. **Andreimar Martins Soares** [USP]

Data da Defesa: 20 de julho de 2010

As sugestões da comissão examinadora e as normas do PPGGB para o formato da dissertação foram contempladas

Professor Dr **Nilson Penha-Silva**
(Orientador)

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me abençoar, me guiar nos caminhos corretos, por sempre ouvir minhas angústias e apelos. Sem sua aprovação nada disso teria acontecido. Obrigada!

A minha família, vovó, papai e irmãos. Obrigada pelo apoio, amor e carinho!

Aos meus companheiros de laboratório, pelo auxílio com os experimentos e pela amizade.

À Junia de Oliveira Costa, pela parceria, amizade, por seu imenso apoio e por tudo que fez por mim até hoje. Conte sempre comigo para o que precisar.

Ao professor Fábio de Oliveira, pelo conhecimento proporcionado, pelas orientações e por escutar minhas lóstimas e desorientações, pelos conselhos pessoais e pela amizade. Que Deus o ilumine sempre!

Ao professor Nilson Penha-Silva, por me acolher e me ajudar.

E, por último ao meu amor. Obrigada, Cleiton, por todos esses anos, pelo apoio, pelos puxões de orelha, pelo entusiasmo com as minhas conquistas, que são suas também. Obrigada por me aceitar em sua vida. TE AMO!!!

Apoio

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR



CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA (UFU)



INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA (INCT)



Sumário

	Página
Lista de abreviaturas	vi
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	viii
Apresentação	01
Capítulo 1 [Fundamentação teórica]	02
Serpentes	03
Acidentes ofídicos	06
Peçonhas	07
Referências	16
Capítulo 2 [Trabalho experimental]	25
Resumo	26
Abstract	27
Introdução	28
Material e métodos	29
Material	29
Animais	29
Isolamento da moonzincina	29
Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	30
Estimativa da concentração da proteína	30
Atividade fibrinogenolítica	30
Efeitos do calor e de inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica	30
Alterações morfológicas induzidas pela moonzincina	31
Avaliação histológica da mionecrose	31
Resultados e discussão	32
Referências	39

Lista de Abreviaturas

AMBIC	Tampão bicarbonato de amônio
Bis-Acrilamida	N, N'-metileno-bis-acrilamida
DEAE	Grupo dietilaminoetil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PB	Peçonha bruta
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SVMPs	Metaloprotease do veneno de serpente
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil etilenodiamina
TRIS	Tris-[hidroximetil]-aminometano

Lista de figuras

	Página
Figura 1.1. Representantes de serpentes brasileiras da família Viperidae	04
Figura 1.2 Dentes inoculadores de peçonha da família Viperidae	04
Figura 1.3 Exemplar da espécie <i>Bothrops moojeni</i>	05
Figura 1.4 Análise proteômica e transcriptômica de peçonha de serpente.....	10
Figura 1.5 Diagrama esquemático da classificação das metaloproteases de peçonhas de serpentes conforme a composição estrutural das enzimas	12
Figura 1.6 Modificação da classificação das metaloproteases de peçonhas de serpente	13
Figura 1.7 Precusores de metaloproteases e de desintegrinas de peçonha de serpente	14
Figura 2.1 Purificação da moozincina da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i>	34
Figura 2.2 Proteólise do fibrinogênio bovino pela moozincina	35
Figura 2.3 Micrografia do músculo gastrocnemius 24 h após a injeção de 50 µg de PB de <i>B. moojeni</i> e 50 µg of moozincina em 50 µL de salina e coloração com hematoxilina-eosina	36
Figura 2.4 Micrografia de tecido pulmonar de camundongos 24 h após injeção de 50 µg de PB de <i>B. moojeni</i> e 50 µg moozincina em 100 µL de salina e coloração com hematoxilina-eosina	37

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1.1. Componentes das peçonhas de serpente	08
Tabela 1.2. Proteases isoladas de peçonhas de serpentes botrópicas.....	12

Apresentação

Essa dissertação de mestrado foi preparada de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Teve como objetivo purificar uma metaloprotease da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* e caracterizá-la quanto a aspectos bioquímicos e funcionais. Essa caracterização compreendeu: **1)** avaliação de seu grau de pureza e de sua massa molecular; **2)** determinação de sua atividade proteolítica em relação aos substratos caseína, albumina, fibrinogênio e azocaseína; **3)** análise de sua estabilidade enzimática frente à temperatura, pH e ação de alguns inibidores enzimáticos; e **4)** caracterização de sua atividade hemorrágica, coagulante e anticoagulante, e toxicidade em órgãos e músculo.

Os objetivos foram atingidos e resultaram no isolamento de uma protease que foi designada como **moozincina**.

O **capítulo 1** busca fornecer a motivação e contextualização dessas tarefas no âmbito da literatura internacional. As referências utilizadas neste capítulo foram buscadas nos serviços de indexação 'Scielo', 'Web of Knowledge' e 'Scopus'. Ele mostra a importância da serpente *Bothrops moojeni* entre as serpentes do Brasil e do mundo, sob os pontos de vista da distribuição e epidemiologia dos acidentes ofídicos, e termina com uma apresentação sobre o 'estado da arte' do isolamento e caracterização de proteases em serpentes botrópicas.

O **capítulo 2** apresenta um relatório das tarefas executadas para purificação e caracterização bioquímica e funcional da **moozincina**, no formato e linguagem do artigo científico submetido à publicação, de acordo com os padrões exigidos pelo periódico.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Serpentes

As serpentes são animais pertencentes ao filo Chordata, sub filo Vertebrata, classe Reptilia, ordem Squamata, sub-ordem Serpentes [Pough *et al.*, 1999]. Elas constituem o segundo grupo mais diversificado dos répteis, com aproximadamente 2700 espécies [Pough *et al.*, 2001]. No Brasil, já foram catalogadas 371 espécies de serpentes, agrupadas nas seguintes famílias: Anomalepididae (representada por 7 espécies), Leptotyphlopidae (14 espécies), Typhlopidae (6 espécies), Aniliidae (1 espécie), Tropidophiidae (1 espécie), Boidae (12 espécies), Colubridae (34 espécies), Dipsadidae (241 espécies), Elapidae (27 espécies) e Viperidae (28 espécies) [Bérnils, 2010].

As serpentes habitam preferencialmente regiões temperadas e tropicais, ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais de proliferação de roedores em zonas rurais e periferia das grandes cidades [Fundação Nacional de Saúde, 2001]. Elas são animais ectotérmicos, por precisarem de fontes externas de calor para sua sobrevivência [Green, 1997; Ciscotto, 2005]. Podem viver em ambientes aquáticos (marinho ou água doce) ou terrestres, apresentando habitat fossorial, terrestre e arborícola [Seigel e Collins, 1993; Ciscotto, 2005]. Possuem hábitos noturnos e são considerados mais agressivos quando comparados com outros animais peçonhentos. Ao se sentirem ameaçadas, as serpentes atacam em silêncio [Fundação Nacional de Saúde, 2001].

Elas podem ser classificadas em dois grandes grupos básicos: as peçonhentas, inoculadoras de peçonha e as não peçonhentas, ambas encontradas no Brasil [Cardoso *et al.*, 2003]. O país conta com duas famílias de serpentes peçonhentas: Elapidae e Viperidae [Ribeiro *et al.*, 1995; Hill *et al.*, 2000; Fundação Nacional de Saúde, 2001; Azevedo-Marques *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003].

A família Elapidae encontra-se amplamente distribuída pelo mundo, com aproximadamente 250 espécies. Os elapídeos têm espécies famosas, como as “najas” asiáticas e africanas, e as temidas “mambas” do continente africano. Nas Américas, a família está representada pelas chamadas “cobras corais”, das quais, na fauna brasileira, são reconhecidas 22 espécies, a maioria pertencendo ao gênero *Micrurus*, o principal gênero, composto por cerca de 18 espécies distribuídas por todo o Brasil. São animais de pequeno porte, com tamanho de até 1 metro. São popularmente conhecidas como coral, coral verdadeira ou boicorá. São caracterizadas visualmente por apresentarem anéis vermelhos, pretos e brancos. Essas serpentes são bem menos agressivas, têm habitat subterrâneo, apresentam presa inoculadora pequena e não têm a mesma possibilidade de abertura da boca que outras serpentes. Raramente causam acidentes e

quando o fazem, geralmente picam os dedos da mão de indivíduos que as manipulam [Fundação Nacional de Saúde, 1998; Jorge e Ribeiro, 1990; Filho, 1997]. O que distingue as corais das não peçonhentas (falsas corais) é a presença das presas inoculadoras de peçonha [Barraviera, 1999; Cardoso *et al.*, 2003].

A família Viperidae apresenta cerca de 250 espécies distribuídas pelo mundo e 28 espécies distribuídas pelo Brasil. Abrange os gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops*, *Caudisona*, *Lachesis* e *Rhinocerothis* [Bérnils, 2010] sendo facilmente identificadas pela cabeça triangular, recoberta por pequenas escamas de aspecto similar às do corpo, além da presença de fosseta loreal entre o olho e a narina [Fundação Nacional de Saúde, 2001]. Os principais representantes desta família são as jararacas, surucucus e cascavéis (Figura 1.1). O par de dentes para inoculação de peçonha dos indivíduos desta família é longo, dianteiro e curvado para trás, se movimentando para frente no momento do bote (Figura 1.2) [Fundação Nacional de Saúde, 2001].

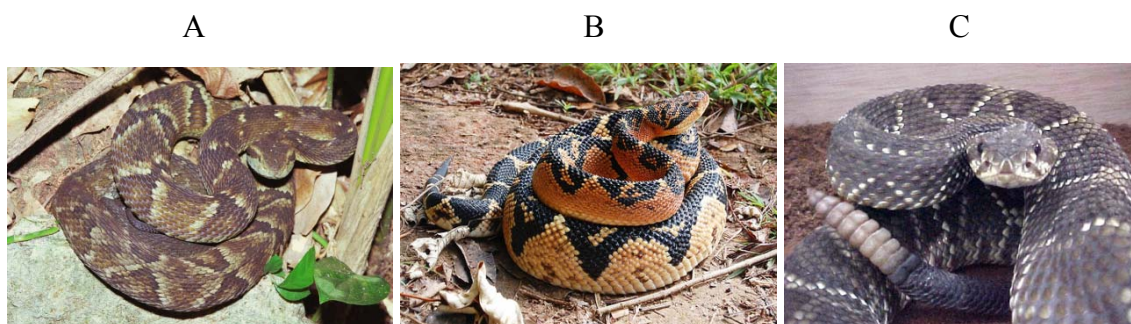


Figura 1.1: Representantes de serpentes brasileiras da família Viperidae. A representado pela espécie *Bothrops jararaca*, B *Lachesis muta* e C *Crotalus durissus*.

Fontes: http://www.ra-bugio.org.br/images/anfibios/anf_sob_00_68g.jpg [acesso em 15/02/10] e http://www.bioatividade.hpg.ig.com.br/Cobras/Cascavel_sul2.jpg [acesso em 14/03/10].



Figura 1.2: Dentes inoculadores de peçonha da família Viperidae. Fonte: <http://www.brasilecola.com/upload/e/ofidismo.jpg> [acesso em 07/01/10].

O gênero *Bothrops* é responsável por cerca de 73,5% dos 20.000 acidentes ofídicos anuais que o Brasil registra [Guia de Vigilância Epidemiológica, 2008]. Este gênero possui cauda lisa e suas cores variam muito dependendo da espécie e da região onde vivem. São conhecidas como jararacas, jararacuços, caiçaca, dentre outros nomes. Habitam zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores [Cardoso, et al. 2003]. Têm hábitos noturnos ou crepusculares e podem ser agressivas quando se sentem ameaçadas [Araújo e Martins, 2007].

A serpente da espécie *Bothrops moojeni* descrita por Hoge [1965] consiste na principal espécie de *Bothrops* dos cerrados do Brasil Central, distribuindo-se desde o Paraná até o Maranhão. É uma das poucas espécies que consegue se adaptar bem aos ambientes modificados, além de apresentar comportamento bastante agressivo e ter um porte avantajado, podendo superar 1,5 m de comprimento [Fundação Nacional de Saúde, 2001]. Possui cor mais clara que outras jararacas. O desenho do dorso pode formar triângulos ou arcos escuros azuis, margeados de branco, com o vértice atingindo o fio das costas (Figura 1.3). Apresenta grande variação da tonalidade numa mesma ninhada (polimorfismo). Têm fosseta loreal e a fêmea apresenta a cauda mais curta que a do macho. Alcança até 1,50 m de comprimento. Alimenta-se de pequenos mamíferos, aves, lagartos, serpentes e anfíbios. Com hábitos noturnos e terrestres, esconde-se em tocas e troncos ocos. Para capturar diferentes presas dispõem de uma armadilha eficiente: abanam a ponta da cauda que, como se fosse uma isca, acaba atraindo anfíbios e lagartos que rapidamente são mortos. Vivípara, tem uma única ninhada por ano. No início da estação chuvosa, após quatro meses de gestação, costumam nascer de 12 a 14 filhotes, mas esse número pode ser superior. Vivem em média 15 anos. Habitam campos e cerrados [CEMIG, 2003].



Figura 1. 3: Exemplar da espécie *Bothrops moojeni*.

Fonte: http://ambientes.ambientebrasil.com.br/fauna/repteis/jararaca_%28bothrops_moojeni%29.html.
[acesso em 23/03/10].

Acidentes ofídicos

Os acidentes ofídicos representam sérios problemas para a saúde pública, devido à alta frequência com que ocorrem [Pinho e Pereira, 2001]. Nestes eventos podem ocorrer desde uma arranhadura e ou perfuração com ou sem envenenamento, até dilaceração dos tecidos, dependendo da espécie da serpente e as condições em que o acidente ocorre [Fundação Nacional de Saúde, 2001]. A letalidade dos acidentados varia em diferentes regiões do mundo [Fundação Nacional de Saúde, 1991]. Na África, ocorrem de 400 a 1.000 mortes por ano, causadas principalmente pelas serpentes conhecidas como *Naja* [Feitosa *et al.*, 1997]. Na Ásia, principalmente no Paquistão, Índia Birmânia, os acidentes ofídicos provocam de 25.000 a 35.000 óbitos por ano, sendo causados pela serpente *Vipera Russelli* [Ribeiro *et al.* 1995]. No Japão a incidência geral é de aproximadamente 1/100.000 habitantes e a letalidade é inferior a 1% [Chippaux, 1998].

Entre os países sul-americanos, o Brasil é o que apresenta maior número de acidentes por ano. Somente no ano de 2005 foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 97.244 envenenamentos por animais peçonhentos, dentre os quais as serpentes contribuíram com 28.702 casos (29,52%) [SINAN, 2010]. Segundo Bochner e Struchiner [2003], desde os trabalhos de Vital Brazil, a média anual é de cerca de vinte mil acidentes ofídicos por ano. Estes acidentes são mais freqüentes nos meses de novembro a abril, ocorrem durante o dia, atingem mais os membros inferiores dos acidentados, geralmente trabalhadores rurais do sexo masculino, na faixa etária de 15 a 49 anos. A ocorrência relaciona-se, principalmente, às condições climáticas e também ao aumento da atividade humana no campo, seja profissional ou lazer. Aproximadamente 73,5% dos envenenamentos são causados pelo gênero *Bothrops* [Guia de Vigilância Epidemiológica, 2008].

A soroterapia específica ou com soro polivalente é o ponto mais importante do tratamento. O soro antiofídico constitui-se na sua parte ativa de várias imunoglobulinas e é purificado principalmente do soro de cavalos previamente imunizados com a peçonha de determinado gênero de serpente [Castro, 2006]. A ação do soro antiofídico baseia-se na formação de um complexo entre antígeno com anticorpos específicos [Chippaux e Goyffon, 1998]. No Brasil, os laboratórios que produzem esses imunoderivados para a rede pública são: Instituto Butantan, Fundação Ezequiel Dias e Instituto Vital Brazil [Fundação Nacional de Saúde, 2001]. Entretanto, o soro é apenas um neutralizador da peçonha, não determinando a regeneração das hemácias, do

endotélio ou dos tecidos em geral, mas evita a progressão destes fenômenos. Atualmente emprega-se uma dose menor que no passado. Isto se deve a estudos realizados com doses menores que garantiram resultados satisfatórios e, conseqüentemente, menos efeitos adversos e redução dos custos [Silveira *et al.*, 1992]. Medidas de suporte geral incluem manter elevado e estendido o membro afetado, utilizar analgésicos, hidratação, procurando manter o débito urinário entre 30 a 40 ml/h no adulto e de 1 a 2 ml/kg/h na criança [Estrade *et al.*, 1989].

Peçonhas

As peçonhas de serpentes são produzidas em glândulas especializadas, capazes de sintetizar e secretar uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas. São capazes de paralisar e matar outros organismos, além de contribuir para a defesa do animal contra predadores ou agressores. Cerca de 90% do peso seco das peçonhas de serpentes são constituídos por proteínas e enzimas como fosfolipases A₂, hialuronidases, L-amino-oxidases, metaloproteases e serinoproteases. Os demais componentes são peptídeos, compostos orgânicos de baixa massa molecular, como carboidratos e nucleotídeos, e compostos inorgânicos como cálcio, potássio, zinco [Matsui *et al.*, 2000; Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006] como mostrado na **Tabela 1.1**.

Tabela 1.1. Componentes das peçonhas de serpente.

Protéicos	Enzimáticos	Acetilcolinesterases	
		ADPases e ATPases	
		Aminotransferases	
		β -glicosaminidases	
		Catalases	
		Fatores semelhantes a proteínas de veneno de cobra (CVF)	
		Fosfoesterases	Fosfomonoesterases Fosfodiesterases
		Hialuronidases	
		L-aminoácido-oxidases	
		NAD-nucleosidases	
		Fosfolipases A ₂ (PLA2)	
		Proteases	Aspartil-proteases Tiol-proteases Metaloproteases Serinoproteases
		Não-enzimáticos	Ativadores de proteína C
	Fatores de crescimento (NGF e VEGF)		
	Inibidores de formação de complexos protrombinase		
	Lectinas		
	Precusores de peptídeos bioativos		
	Proteínas ligantes do fator de von willebrand		
	Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs)		
	Inibidores enzimáticos		
Peptídeos	Tóxicos (citotóxicos, miotóxicos, cardiotoxícos, neurotóxicos)		
	Desintegrinas		
	Natriuréticos		
	Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs)		
Componentes orgânicos de baixa massa molecular	Aminas	Serotonina Histamina	
	Aminoácidos		
	Carboidratos		
	Citratos		
	Nucleosídeos		
Componentes inorgânicos	Cálcio		
	Cobalto		
	Ferro		
	Fósforo		
	Potássio		
	Magnésio		
	Manganês		
	Sódio		
Zinco			

Fonte: [Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006].

A composição qualitativa e quantitativa das peçonhas está diretamente ligada a diversos fatores como espécie da serpente, idade, alimentação e período do ano em que foi feita a coleta [Barraviera, 1999; Cardoso *et al.*, 2003; Ramos e Selistre-de Araújo, 2006].

Os envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* causam efeitos locais como um leve edema até dor, hemorragia, necrose extensa e abscesso que, dependendo do local afetado, tempo decorrido entre o acidente e aplicação do soro e a quantidade de peçonha injetada, podem exigir a amputação do membro acometido [Oliveira, 2009]. Dentre as manifestações sistêmicas ocorrem: alteração da coagulação sanguínea, sangramento, choque e insuficiência renal [Jorge *et al.*, 1989; Rosenfeld, G, 1965, 1971].

Estes sintomas são causados em decorrência (1) da atividade proteolítica ou fosfolipásica, que determina edema inflamatório na região da picada, (2) da atividade coagulante, que envolve uma ou mais ações semelhante à ação da trombina (‘thrombin-like’), ativadora de protrombina e do fator X, o que promove consumo dos fatores de coagulação com conseqüente alteração da coagulação sanguínea; (3) da atividade hemorrágica, que atua no endotélio vascular na região da picada, ocasionando destruição das proteínas do endotélio e extravasamento do sangue; e, por último, (4) atividade miotóxica responsável por lesar fibras musculares esqueléticas ocasionando a liberação de enzimas e mioglobina para o sangue.

Estudos de proteoma e transcriptoma estimaram que a maioria das peçonhas do gênero *Bothrops* é composta por pelo menos 50% de enzimas proteolíticas dependentes de íons metálicos denominadas de metaloproteases (SVMP’s) (Figura 1.4) [Fox *et al.*, 2006], o que sugere um significativo “papel” para um grande número de patologias associadas ao envenenamento.

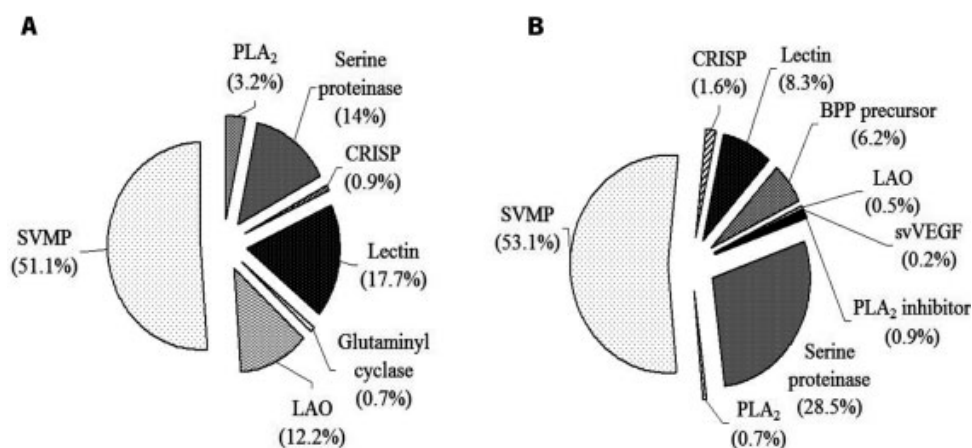


Figura 1.4 – Análise proteômica e transcriptômica de peçonhas de serpente. (A) Composição protéica determinada por proteômica da peçonha de *Bothrops jararaca*, (B) composição de *Bothrops jararaca* determinada por transcriptoma. Fonte: Fox et al., 2006.

Elas compreendem um amplo grupo de proteínas dependentes de zinco pertencentes à família metzincina, que têm em comum um domínio de ligação de zinco com estruturas muito semelhantes entre si [Bjarnason e Fox, 1995; Jia et al., 1996; Matsui et al., 2000; Fox e Serrano, 2005; Wang et al., 2005]. Estas enzimas têm em comum um resíduo de metionina voltado à porção inferior da molécula e um segmento helicoidal na região C-terminal com dois dos três resíduos de histidina envolvidos na ligação de zinco. A metionina forma uma região hidrofóbica embaixo da hélice, onde se encontra o sítio ativo dessas enzimas. Membros dessa família incluem as Reprolisinas ou ADAMs, Serralisinas, Astacinas e Matrixinas (metaloproteases de matrix extracelular, MMPs) [Bode et al., 1993; Ra e Parks, 2007]. As MMPs podem apresentar-se ancoradas na superfície da célula ou secretadas na forma de zimogênio [Bode et al., 1993; Ra e Parks, 2007]. As MMPs possuem um domínio pró-peptídeo aminoterminal que apresenta entre 80-90 aminoácidos, um domínio catalítico e um domínio carboxiterminal ligado a hemopexina. As ADAMs são compostas por mais de 30 membros identificados em várias espécies [Bohm et al., 2005] e caracterizados como glicoproteínas, ancoradas à membrana, com funções proteolíticas associadas a um domínio metaloprotease. Este é regulado por um pró-domínio que bloqueia o acesso do íon zinco [Lu et al., 2007]. O sítio ligante de zinco da família metzincina tem uma sequência de aminoácidos conservada (HEBXHXBGBXH) onde H é histidina, E é ácido glutâmico, G é glicina, B é um resíduo hidrofóbico e X é um aminoácido

qualquer. A remoção do zinco por agentes quelantes como EDTA ou 1-10-fenantrolina elimina completamente a atividade biológica dessas enzimas [Markland, 1998].

O primeiro membro desta família de enzimas de peçonha de serpente que teve sua estrutura tridimensional determinada foi a adamalisina [Gomis-Ruth *et al.*, 1993, 1994]. Esta enzima é uma metaloprotease com 24 kDa, isolada da peçonha de *C. adamanteus*. Ela contém um átomo de zinco e um átomo de cálcio por molécula. A enzima degrada inibidores de proteases no sangue humano inclusive a antitrombina III e α 1-antiproteínase [Kurecki *et al.*, 1978]. Embora não possua atividade fibrinolítica, ela serve como protótipo da estrutura tridimensional de enzimas fibrin(ogen)olíticas de peçonha (22-26 kDa) e de enzimas hemorrágicas com as quais compartilha identidade de sequência de aminoácidos.

As metaloproteases são sintetizadas no citoplasma das células secretoras na glândula de peçonha e transferidas para o retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi e finalmente transportada via grânulos de secreção para o lúmen da glândula [Warshawsky *et al.*, 1973]. As proteínas de peçonha têm uma sequência sinal que é reconhecida pelo retículo endoplasmático (ER) e durante o transporte esta sequência é perdida. Ainda no ER as proteínas são enoveladas, as pontes dissulfeto são formadas/oxidadas, glicosiladas e algumas sofrem multimerização como é o caso das disintegrinas dimericas (PIId e PIIE) [Fox e Serrano, 2008].

Algumas metaloproteases são hemorrágicas, outras não. O mecanismo de ação das metaloproteases está relacionado com proteólise de proteínas da matriz extracelular como fibronectina, laminina, colágeno do tipo IV e gelatina [Markland, 1998], e proteólise de proteínas plasmáticas tais como o fibrinogênio. Estudos com substratos pequenos mostraram que as proteases hemorrágicas preferem hidrolisar as ligações de aminoácidos hidrofóbicos na região amino-terminal [Markland, 1998]. As metaloproteases também podem atuar interagindo com receptores específicos, tais como: integrinas de superfície de plaquetas, células endoteliais e fibroblastos. Estes efeitos podem levar a várias alterações fisiopatológicas, tais como: inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e hemorragias. São exemplos dessas metaloproteases a BthMP, enzima com 23,5 kDa, com atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* [Gomes *et al.*, 2009], a BaltMP-II, uma SVMP isolada de *Bothrops alternatus*, com atividade α -fibrinogenolítica e que promove incoagulabilidade *in vivo* [Costa *et al.*, 2007] (Tabela 1.2), e a alfimeprase,

uma enzima fibrinolítica recombinante derivada de SVMP isolada da peçonha de *Agkistrodon contortrix contortrix* [Toombs, 2001; Ouriel *et al.*, 2005; Moll *et al.*, 2006].

Tabela 1.2. Metaloproteases isoladas de peçonhas de serpentes botrópicas.

Proteases	Atividades	Espécies	Referências
BaltMP-I e BaltMP-II	α -Fibrinogenolítica	<i>Bothrops alternatus</i>	Costa <i>et al.</i> , 2007
BmooMP α -I	α -Fibrinogenolítica	<i>Bothrops moojeni</i>	Bernardes <i>et al.</i> , 2008
BlaH1	Hemorrágica	<i>Bothrops lanceolatus</i>	Stroka <i>et al.</i> , 2005
BjussuMP-I	Hemorrágica	<i>Bothrops jararacussu</i>	Mazzi <i>et al.</i> , 2006
BthMPm	Hemorrágica	<i>Bothrops moojeni</i>	Gomes <i>et al.</i> , 2009
Cotiaractivase	Ativador de protrombina	<i>Bothrops cotiara</i>	Senis <i>et al.</i> , 2006

As SVMPs são classificadas de acordo com a organização de seus multidomínios em três classes [Fox e Serrano, 2008; Wang *et al.*, 2005], como representado na **Figura 1.5**.

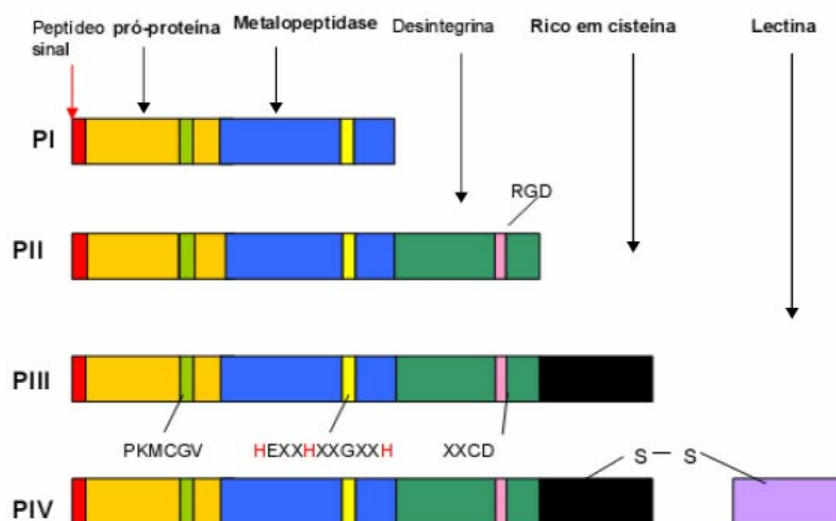


Figura 1.5. Diagrama esquemático da classificação das metaloproteases de peçonhas de serpentes conforme a composição estrutural das enzimas. Fonte: Bjarnason e Fox, 1994.

A classe PI compreende as enzimas que possuem baixa massa molecular, variando entre 20-30 kDa, somente o domínio metaloprotease e fraca atividade hemorrágica, como a atrolisina, isolada da serpente *Crotalus atrox* [Bjarnason e Fox, 1994] e a BnP1, isolada da serpente *Bothrops neuwiedi* [Baldo *et al.*, 2008]. As proteínas da classe PII apresentam massa molecular entre 30-60 kDa e possuem um domínio semelhante a desintegrina ('disintegrin-like') na região carboxi-terminal. As enzimas da classe PIII possuem, além das regiões citadas acima, uma região rica em

cisteína; elas têm massa molecular entre 60-80 kDa e são potencialmente hemorrágicas, como a BjuSSuMP-I (*Bothrops jararacussu*) [Mazzi *et al.*, 2007]. A classe PIV compreende enzimas que possuem 80-100 kDa de massa molecular, com duas subunidades em sua estrutura, uma com domínio metaloprotease semelhante à desintegrina (‘desintegrin-like’), rico em cisteína, e outra com um domínio semelhante a lectina (‘lectin-like’); essas subunidades acham-se conectadas entre si por ligação dissulfeto (**Figura 1.5**). O domínio ‘lectin-like’ é reconhecido por receptores de adesão plaquetária e glicoproteínas de matriz e do plasma [Jia *et al.*, 1997; Kamiguti *et al.*, 2003; Wijeyewickrema *et al.*, 2005].

Recentemente, Fox e Serrano [2008] alteraram a classificação anterior baseados na presença ou ausência de domínios não proteínase observados nos transcritos de mRNA (**Figura 1.6**). Classificaram como PIIa enzimas da classe PII que liberam o domínio semelhante à desintegrina em seu estado nativo, a PIIb para enzimas que não liberam o domínio semelhante à desintegrina, PIIc para enzimas PII diméricas, PIIId e PIIe metaloproteases que possuem o domínio desintegrina sem ter o domínio metaloprotease, a PIIIa para enzimas PIII que têm domínios semelhantes à desintegrina ricos em cisteína, PIIIb para enzimas que liberam seus domínios semelhantes à desintegrina e ricos em cisteína, PIIIc para SVMPs da classe PIII cujas estruturas se organizam na forma de dímeros e PIIId que contém o domínio semelhante a lectina.

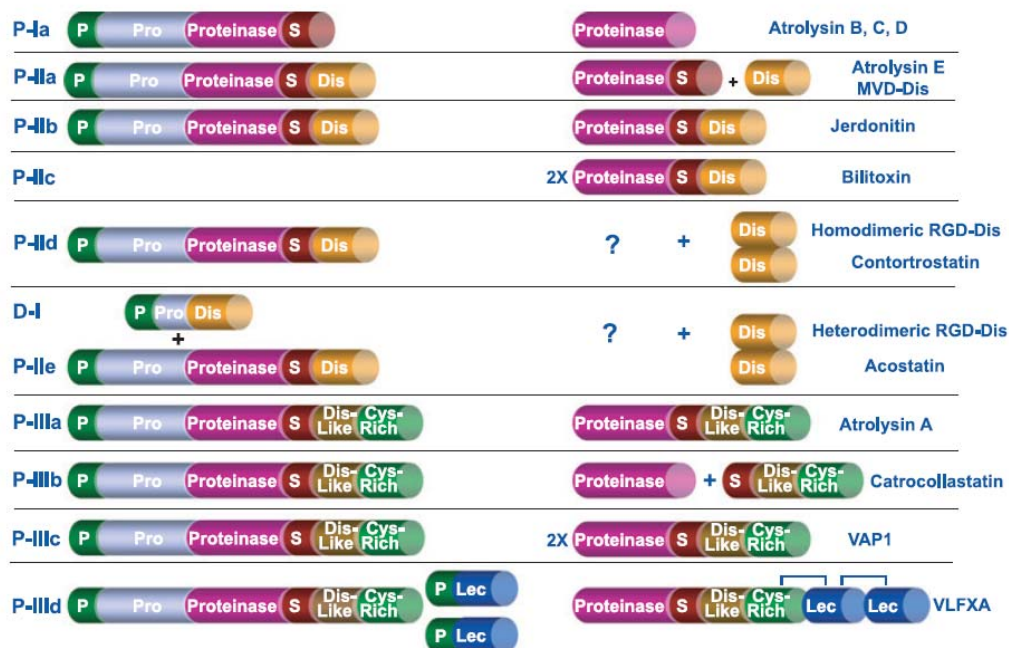


Figura 1.6. Modificação da classificação das metaloproteases de peçonhas de serpente [Fox e Serrano, 2008]. P = peptídeo sinalizador; Pro = segmento da pró-proteína que é

removido durante sua ativação; S = HEBXHXBGBXH; Dis = domínio ‘desintegrina’; ‘Dis-like’ = semelhante à desintegrina; Cys-rich = rico em cisteína; Lec = lectina. Questões marcadas (?) na figura indicam produto processado que não foi identificado na peçonha.

Os precursores das SVMPs têm em sua estrutura um segmento denominado peptídeo sinalizador, que é constituído por 18 aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas, com a função de agir como um marcador da secreção da proteína. O pró-domínio é uma região desses precursores de SVMPs que modula a atividade enzimática por interagir com o domínio catalítico. O domínio catalítico, que confere a atividade enzimática à metaloprotease (MP), é composto por uma sequência de aproximadamente 215 resíduos de aminoácidos, a qual é altamente conservada entre as SVMPs, e possui atividade endopeptidase metal-dependente (**Figura 1.7**).

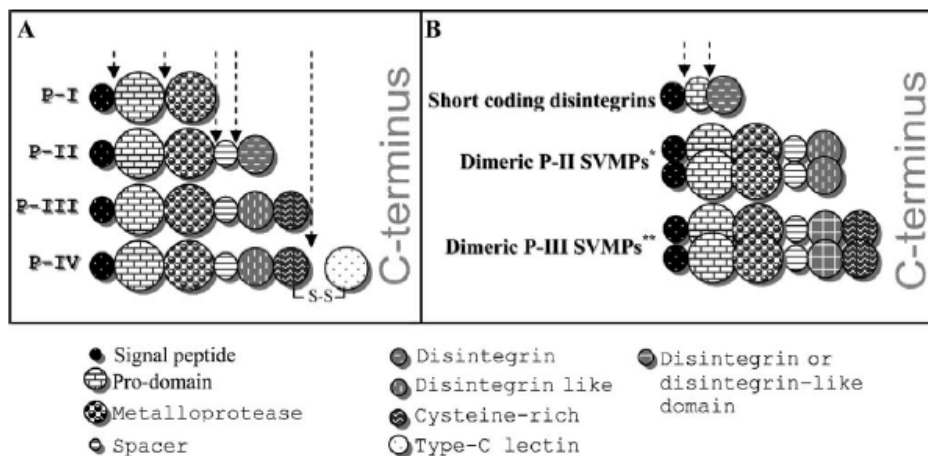


Figura 1.7: Precursores de metaloproteases e de desintegrinas de peçonha de serpente. A) Classificação original proposta para metaloproteases [Bjarnason e Fox, 1994]. B) inserção de desintegrinas sem atividade de metaloprotease e de metaloproteases diméricas [Okuda *et al.*, 2002; Francischetti *et al.*, 2004] nas classes PII [Nikai *et al.*, 2000] e PIII [Cominetti *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 1998, 2001]. As setas indicam interdomínios proteolíticos.

Existem enzimas cujo mecanismo de ação consiste na ação direta sobre o fibrinogênio ou a fibrina, levando à incoagulabilidade sanguínea; essas enzimas são denominadas fibrinogenolíticas e/ou fibrinolíticas, respectivamente. As enzimas fibrinogenolíticas são classificadas conforme a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio [Markland *et al.*, 1991; Markland, 1998]. A primeira classe de fibrinogenases são aquelas com especificidade de hidrólise das cadeias A- α do

fibrinogênio, como a BmooMP α -I, uma metaloprotease com massa molecular de 24,5 kDa que degrada a cadeia A α do fibrinogênio em aproximadamente 5 minutos de incubação [Bernardes *et al.*, 2008]. As enzimas da segunda classe possuem especificidade pela cadeia B- β e geralmente são chamadas de serinoproteases e podem, interferir na cascata de coagulação [Matsui *et al.*, 2000] como a BJ-48, uma enzima ‘thrombin-like’ isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* [Guedes *et al.*, 2008], e a TLBm, enzima isolada da peçonha de *Bothrops marajoensis* [Vilca-Quispe *et al.*, 2010]. As enzimas da terceira classe são aquelas com especificidade pela cadeia γ do fibrinogênio. Este tipo é bastante raro, tendo sido purificada a partir da peçonha de *C.atrox* com massa molecular de 64 kDa [Nikai *et al.*, 1984].

A peçonha da serpente *Bothrops moojeni* é rica em compostos farmacologicamente ativos, principalmente proteases que interferem no sistema hemostático provocando diversas alterações, o que nos induziu a estudar os componentes da peçonha e sua ação proteolítica.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO MS, MARTNS M. The defensive strike of five species of lanceheads of the genus *Bothrops* (Viperidae). *Braz. J. Biol.*, 67, 327-332, 2007.

AZEVEDO-MARQUES MM, CUPO P, HERING, SE. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas, Simpósio: Urgências e Emergências Dermatológicas e Toxicológicas: Medicina, Ribeirão Preto, 36: 480-489 abr/dez 2003.

BALDO C, TANJONI I, LEON IR, BATISTA IFC, DELLA-CASA MS, CLISSA PB, WEINLICH R, LOPES-FERREIRA M, LEBRUN I, AMARANTE-MENDES GP, RODRIGUES VM, PERALES J, VALENTE RH, MOURA-DA-SILVA AM. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon*, 51, 54-65, 2008.

BARRAVIERA B. Venenos, Aspectos Clínicos e Terapêuticos dos Acidentes por Animais Peçonhentos. Editora de Publicações Biomédicas Ltda, 1ª ed, 411 p, 1999.

BERNARDES CP, SANTOS- FILHO NA, COSTA TR, GOMES MSR, TORRES FS, COSTA J, BORGES MH, RICHARDSON M, DOS SANTOS DM, PIMENTA AMC, HOMSI-BRANDEBURGO MI, SOARES AM, OLIVEIRA, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 51, 574-584, 2008.

BÉRNILS, RS. (org.). *Brazilian reptiles – List of species*. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. 2010.

BJARNASON JB, FOX JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol.*, 62, 325-372, 1994.

BJARNASON JB, FOX JW. Snake venom metalloproteinases: reprotlysins. *Methods Enzymol.*, 248, 345-368, 1995.

BOCHNER R, STRUCHINER CJ. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cadernos de Saúde Pública* 19, 7-16, 2003.

BODE W, GOMIS-RUTH FX, STOCKLER W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments

(HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins”. *FEBS Lett* 331,134-140, 1993.

BOHM BB, AIGNER T, ROY B, BRODIE TA, BLOBEL CP, BURKHARDT H. Homeostatic effects of the metalloproteinases disintegrin ADAM 15 in degenerative cartilage remodeling. *Arthritis Rheum* 52, 1100-1109, 2005.

CARDOSO JLC, FRANÇA FO, WEN FH, MÁLAQUE CM, HADDAD JR. *Animais peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo, Ed. Sarvier-FAPESP, 1ª ed., 459 p, 2003.

CASTRO I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas no acidente ofídico, com ênfase à toxicidade renal. *O Mundo da Saúde*, 30, 644-653, 2006.

CEMIG. Guia Ilustrado de Animais do Cerrado de Minas Gerais. 2ª. ed. Editare, 2003.

CHIPPAUX JP, GOYFFON M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*, 36, 823-846, 1998.

CHIPPAUX JP. Snakebites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ*, 76, 515-24, 1998.

CISCOTTO PHC. Purificação e caracterização biológica e estrutural (antibacteriana, 115 antiparasitária, hemolítica e antigênica) de dois componentes protéicos do veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. Dissertação de Mestrado, 2005.

COMINETTI MR, RIBEIRO JU, FOX JW, SELISTRE-DE-ARAUJO HS. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with a 5b1 integrin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 416, 171-179, 2003.

COSTA JO, PETRI CB, HAMAGUCHI A, HOMSI-BRANDEBURGO MI, OLIVEIRA CZ, SOARES AM, OLIVEIRA F. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* snake venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 13, 640-654, 2007.

ESTRADE G, GARNIER D, BERNASCONI F, DONATIEN Y. [Pulmonary embolism and disseminated intravascular coagulation after being bitten by a *Bothrops lanceolatus* snake. Apropos of a case]. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 82, 1903-1905, 1989.

FEITOSA RFG, MELO IMLA, MONTEIRO HSA. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará - Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 30, 295-301, 1997.

FILHO AA. Acidentes provocados por animais peçonhentos. In: Ratton ILA (ed). *Medicina Intensiva*, 2ª ed. São Paulo, Ed. Atheneu, 574-579, 1997.

FOX JW, SERRANO SMT. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases, *Toxicon*, 45, 969-985, 2005.

FOX JW, MA L, NELSON K, SHERMAN N. E, SERRANO SM. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. *Toxicon*, 47, 700-714, 2006.

FOX JW, SERRANO SMT. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *The FEBS Journal* 275, 3016-3030, 2008.

FRANCISCHETTI IMB, MY-PHAM V, HARRISON J, GARFIELD MK, RIBEIRO JMC. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. *Gene*, 337, 55-69, 2004.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília, Ministério da Saúde, 1998.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília, Ministério da Saúde, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Ofidismo: Análise Epidemiológica*. Brasília, Ministério da Saúde, 1991.

GOMES MSR, MENDES MM, OLIVEIRA F, ANDRADE RM, BERNARDES CP, HAMAGUCHI A, ALCÂNTARA TM, SOARES AM, RODRIGUES VM, HOMSI-BRANDEBURGO MI. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, 53, 24-32, 2009.

GOMIS-RUTH FX, KRESS LF, BODE W. First structure of a snake venom metalloproteinase: A prototype for matrix metalloproteinases collagenases. *Embo J.*, 12, 4151-4157, 1993.

GOMIS-RUTH FX, KRESS LF, KELLERMANN J, MAYR I, LEE X, HUBER R, BODE W. Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zinc-endopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. *J. Mol. Biol.* 239, 513, 1994.

GREEN HW. *Snakes. The evolution of mystery in nature*. Berkeley: University of California Press, 351 pp, 1997.

GUEDES HLM, SILVA JR, FP, CORREA NETTO C, SALLES CMC, ALEXANDRE G, OLIVEIRA CLP, TORRIANI I, SIMONE SG. Structural characterization and low-resolution model of BJ-48, a thrombin-like enzyme from *Bothrops jararacussu* venom. *Biophysical Chemistry*, 132, 159-164, 2008.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, Caderno 14, 24p. 2008.

HILL RE, MACKESSY SP. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. *Toxicon* 38, 1663-1687, 2000.

HITE LA, JIA LG, BJARNASON JB, FOX JW. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 308, 182-191, 1994.

HOGUE AR. Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). *Memórias do Instituto Butantan*, 32: 109-184, 1965.

JIA LG, SHIMOKAWA KI, BJARNASON JB, FOX JW. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon*, 34, 1269-1276, 1996.

JIA LG, WANG XM, SHANNON JD, BJARNASON JB, FOX JW. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. *J. Biol. Chem.*, 272, 13094-13102, 1997.

JORGE MT, RIBEIRO LA. Acidentes por animais peçonhentos. In: Amato Neto V & Baldy JLS. Doenças transmissíveis. 3ª ed. São Paulo, Sarvier, 133-141, 1989.

JORGE MT, RIBEIRO LA. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Ass. Med. Bras.*, 36, 66-77, 1990.

KAMIGUTI AS, GALLAGHER P, MARCINKIEWICZ C, THEAKSTON RD, ZUZEL M, FOX JW. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *FEBS Lett.*, 549, 129-134, 2003.

KURECKI T, LASKOWSKI M, KRESS LF. Purification and some properties of two proteinases from *Crotalus adamanteus* venom that inactive human α proteinase inhibitor. *J.Biol.Chem.*, 253, 8340, 1978.

LU X, LU D, SCULLY MF, KAKKAR VV. Structure activity relationship studies on ADAM protein integrin interactions. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med.Chem.*5, 29-42, 2007.

MARKLAND FS. Inventory of a-and b-fibrinogenases from snake venoms. *Thromb. Haemost.*, 65, 438, 1991.

MARKLAND FS. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An updated inventory. *Thromb.Haemost.*, 3, 668, 1998.

MASUDA S, HAYASHI H, ARAKI S. Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/disintegrin family. *Eur. J. Biochem.*, 253, 36-41, 1998.

MASUDA S, HAYASHI H, ATODA H, MORITA T, ARAKI S. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur. J. Biochem.*, 268, 3339-3345, 2001.

MATSUI T, FUJIMURA Y, TATANI K. Review: Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Bioch. Biophys. Acta*, 1477, 146-156, 2000.

MAZZI MV, MAGRO AJ, AMUI SF, OLIVEIRA CZ, TICLI FK, STÁBELI RG, FULY AL, ROSA JC, BRAZ ASK, FONTES MRM, SAMPAIO SV, SOARES AM. Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjussuMP-I: A RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J. Mol. Graph.*, 26, 69-85, 2007.

MOLL S, KENYON P, BERTOLI L, DE MAIO J, HOMESLEY H, DEITCHER SR. Phase II trial of alfineprase, a novelacting fibrin degradation agent, for occluded central venous access devices. *J. Clin. Oncol.*, 24, 3056-3060, 2006.

NIKAI T, MORI N, KISHIDA M, SUGIHARA H, TU AT. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. *Arc.Biochem.Biophy.* 321, 309, 1984.

NIKAI T, TANIGUCHI K, KOMORI Y, MASUDA K, FOX JW, SUGIHARA H. Primary structure and functional characterization of bilitoxin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, 378, 6-15, 2000.

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

OLIVEIRA RB. Fatores epidemiológicos e clínicos associados à incoagulabilidade sanguínea no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. *Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia*, 2009.

OURIEL K, CYNAMON J, WEAVER FA, DARDIK H, AKERS D, BLEBEA J, GRUNEIRO L, TOOMBS CF, WANG-CLOW F, MOHLER M, PENA L, WAN CY,

DEITCHER SR. A phase I trial of alteplase for peripheral arterial thrombolysis. *J. Vasc. Interv. Radiol.*, 16, 1075-1083, 2005.

PINHO FMO, PEREIRA ID. Ofidismo. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, 47, 24-29, 2001.

POUGH FH, HEISER JB, MCFARLAND WN. *A vida dos vertebrados*. 2ª ed., São Paulo, Atheneu, 798, 1999.

POUGH FH, ANDREWS RM, CADLE JE, CRUMP ML, SAVITZKY AH, WELLS KD. *Herpetology*. Prentice-Hall, NJ, Prentice-Hall Inc., 612, 2001.

RA HJ, PARKS WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol.* 26, 587-596, 2007.

RAMOS OHP, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS. Review: Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Compar. Biochem. Phys., Part C*, 142, 328-346, 2006.

RIBEIRO LA, JORGE MT, IVERSSON LB. Epidemiologia do acidente por serpentes peçonhentas: Estudos de casos atendidos em 1988. *Rev de Saúde Pública*, 29 (5), 1995.

ROSENFELD G. Moléstias por venenos animais. *Pinheiros Terapêuticos*, 17, 3-15, 1965.

ROSENFELD G. Symptomatology, pathology, and treatment of snakebite in South America. In: Bucherl W & Buckley EE. *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic Press, v. 2, p. 345-384, 1971.

SEIGEL RA, COLLINS JT. Snakes: ecology & Behavior. Ed. McGraw-Hill: 414p. *apud* CISCOTTO PHC (2005) Purificação e caracterização biológica e estrutural (antibacteriana, antiparasitária, hemolítica e antigênica) de dois componentes protéicos do veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. Dissertação de Mestrado, 1993.

SENIS YA, KIM PY, FULLER GL, GÁRCIA A, PRABHAKAR S, WILKINSON MC, BRITTAN H, ZITZMANN N, WAIT R, WARRELL DA, WATSON SP, KAMIGUTI

AS, THEAKSTON RDG, NESHEIM ME, LAING GD. Isolation and characterization of cotiaractivase, a novel low molecular weight prothrombin activator from the venom of *Bothrops cotiara*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1764, 863-871, 2006.

SILVA CJ, JORGE MT, RIBEIRO LA. Epidemiology of snakebite in a central region of Brasil. *Toxicon*, 41, 251-255, 2003.

SILVEIRA PF, SCHIRIPA LN, CARMONA E, PICARELLI, ZP. Circulating vasotocin in the snake of *Bothrops jararaca*. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.*, 103:59-64, 1992.

SINAN - Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Estatística 2006. Ministério da Saúde. Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb> [Acessado em 20 de março de 2010].

STROKA A, DONATO L, BON C, HYSLOP S, LÔBO DE ARAÚJO A. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. *Toxicon*, 45, 411-420, 2005.

TOOMBS CF. Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis. *Haemostasis*, 31, 141-147, 2001.

VILCA-QUISPE A, PONCE-SOTO LA, FLAVIA VISCHI WINCK F, MARANGONI S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. *Toxicon*, 55, 745-753, 2010.

WANG WJ, SHIH C, HUANG, T. Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochimie*, 87, 1065-1077, 2005.

WARSHAWSKY H, HADDAD A, GONCALVES RP, VALERI V E DE LUCCA FL. Fine structure of the venom gland epithelium of the South American rattlesnake and radioautographic studies of protein formation by the secretory cells. *Am J Anat* 138, 79-119, 1973.

WIJEYEWICKREMA LC, BERNDT MC, ANDREWS RK. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*, 45, 1051-1061, 2005.

CAPÍTULO 2

TRABALHO EXPERIMENTAL

RESUMO

Purificação e caracterização funcional de uma nova metaloprotease não hemorrágica da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*

As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* contêm proteases que contribuem com efeitos locais vistos no envenenamento. Neste estudo, uma metaloprotease não hemorrágica foi isolada da peçonha de *B.moojeni*. Esta enzima foi isolada por uma combinação de cromatografia de troca iônica e exclusão molecular e nomeada moozincina. A enzima teve seu grau de pureza avaliado em SDS PAGE corado com azul brilhante de Comassie e mostrou uma massa molecular aparente de 30 kDA. A moozincina não induz hemorragia, atividade coagulante, desfibrinação ou atividade fosfolipásica, mas mostrou atividade proteolítica sobre fibrinogênio bovino. A moozincina degrada inicialmente a cadeia A α do fibrinogênio, em seguida a cadeia B β e não mostra efeitos sobre a cadeia γ . A atividade da moozincina foi inibida após incubação com agentes quelantes (EDTA, 1,10 fenantrolina) e agente redutor β -mercaptoetanol) indicando ser uma protease dependente de íon metálico. Em contrapartida, a aprotinina e a benzamidina não afetaram sua atividade. A moozincina se apresentou ativa em pH 7.0 a 11, sendo estável em solução até 50 °C. Sua atividade fibrinogenolítica foi completamente perdida em temperatura igual ou superior a 60 °C. Observações histológicas mostraram que a administração intramuscular de moozincina induziu baixa mionecrose, evidenciada por degeneração hialina e infiltração leucocitária. Moozincina induziu alterações celulares nos pulmões, mas não alterou fígado, rins e células cardíacas.

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*, veneno de serpente, fibrinogenase, metaloprotease.

ABSTRACT

Purification and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops moojeni* snake venom

Bothrops snake venoms contain proteases that contribute to the local effects seen after envenoming. In this study, a non-hemorrhagic metalloprotease was isolated from the venom of *B. moojeni*. The enzyme was isolated by a combination of ion exchange and gel filtration chromatographies and named Moozincin. The enzyme was purified to homogeneity as judged by its migration profile in SDS-PAGE stained with coomassie blue, and showed a molecular mass of about 30 kDa. Moozincin did not induce hemorrhage, blood clotting, defibrinating or phospholipase A₂ activities, but displayed proteolytic activity on bovine fibrinogen. Moozincin cleaves the A α -chain of fibrinogen first, followed by the B β -chain, and shows no effects on the γ -chain. The fibrinogenolytic activity of Moozincin was abolished after incubation with a chelating agent (EDTA, 1,10-phenantroline) β -mercaptoethanol, indicating that it is metal ion-dependent. In contrast, aprotinin and benzamidine did not affect these activities. Moozincin was active at pH 7 - 11 and was stable in solution at up to 50 °C; fibrinogenolytic activity was completely lost at ≥ 60 °C. Histological observations showed that Moozincin induces low myonecrosis upon intramuscular injection in mice evidenced by hyaline degeneration and leukocyte infiltrate. Moozincin induced cell alterations in lung, but not alter liver, kidney and heart cells.

Keywords: *Bothrops moojeni*, snake venom, fibrinogenase, metalloprotease.

INTRODUCTION

Envenoming by Bothropic snake is characterized by prominent local tissue damage (edema, pain, hemorrhage and necrosis) and by systemic disturbances such as coagulopathies, systemic hemorrhage, renal failure and local damage [Rucavado et al., 2002](#)].

Recently, a number of SVMPs have been identified in snake venoms of the *Bothrops* genus, for example, *B. jararacussu* [[Marcussi et al., 2007](#)], *B. leucurus* [[Simon -Sanchez et al., 2007](#)], *B. neuwiedi* [[Baldo et al., 2008](#)], *B. moojeni* [[Bernardes et al., 2008](#); [Gomes et al., 2009](#)], *B. jararaca* [[Oliveira et al., 2009](#)], *B. alternatus* [[Gay et al., 2009](#)] and *B. atrox* [[Sanchez et al., 2010](#)]. SVMPs are a heterogeneous group of proteins with a wide range of molecular masses between 15 and 380 kDa [[Kini and Evans, 1992](#)]. SVMPs are classified according to their multidomain organization in classes PI to PIV [[Fox and Serrano, 2005](#)]. P-I class proteins have only the metalloproteinase domain; P-II class has a metalloproteinase followed by a disintegrin-like domain; P-III Class include a cysteine-rich domain, in addition to proteinase and disintegrin-like domains and P-IV presents, besides the three described domains, an additional lectin-like domain. The P-I class comprise the smaller hemorrhagins, having molecular masses of 20–30 kDa; the P-II class is the medium-size enzymes with molecular masses of 30–50 kDa; the P-III class is formed of the most potent hemorrhagic toxins, with molecular masses of 50–80 kDa and the P-IV class is made up of proteins with molecular masses of 80–100 kDa and includes the less toxic hemorrhagins [[Hite et al., 1994](#); [Bjarnason and Fox, 1994](#); [Bjarnason and Fox, 1995](#)]. The review of [Laing and Moura-da-Silva \[2005\]](#) show that SVMPs have been the focus of many investigations, mostly due to their medical relevance in snakebite accidents, as well as valuable tools for understanding the molecular mechanisms of action of this toxins. In this work, we describe the purification and functional characterization of a non-hemorrhagic fibrinolytic metalloprotease from *B. moojeni* venom.

MATERIAL AND METHODS

Material

Desiccated *B. moojeni* venom was purchased from Pentapharm of Brazil (Uberlândia, MG, Brazil). Acrylamide, ammonium persulfate, benzamidine, bromophenol blue, ethylenediaminetetracetic acid (EDTA), bovine fibrinogen, β -mercaptoethanol, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide, sodium dodecyl sulphate (SDS) and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Glycine, Tris, molecular mass markers for electrophoresis and all chromatographic media were from Amersham Pharmacia Biotech. All other reagents used were of analytical grade.

Animals

Adult male mice were maintained under standard conditions (temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 and 70% of relative humidity, 12 h light/dark cycle and diet and water ad libitum).

The experiments were carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations in conscious animals set by the Ethical Committee of University of Uberlândia, MG, Brazil.

Isolation of Moozincin

Moozincin was purified from *B. moojeni* snake venom using the methodology previously described by [Bernardes et al. \[2008\]](#). Crude venom (200 mg) was dissolved in 50 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8) and clarified by centrifugation at 10,000g for 10 min. The supernatant solution was chromatographed on a DEAE-Sephacel column (1.7×15 cm), previously equilibrated with 50 mM, pH 7.8, ammonium bicarbonate and eluted with a concentration gradient (50 mM – 450mM) of the same buffer. Fractions of 3.0 mL/tube were collected, their absorbances at $\lambda=280$ nm were read and those corresponding to peak D6 were pooled, lyophilized, dissolved in 50 mM,

pH 7.8, ammonium bicarbonate and applied on a 1×100 cm Sephadex G-75 column, previously equilibrated with the same buffer.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoreses (SDS-PAGE)

Electrophoresis using polyacrylamide gels (SDS–PAGE) were performed as described by Laemmli (1970) using 14% gels. Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris–glycine buffer, pH 8.3, containing 0.01% SDS. The molecular mass standard proteins used were phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactoalbumin (14.4 kDa). The gels were stained with Coomassie blue. The relative molecular mass of the purified enzyme was estimated by Kodak 1D image analysis software. According to migration of molecular mass markers.

Estimation of Protein Concentration

Protein concentration was determined according to a microbiuret method described by [Itzhaki and Gill \[1964\]](#), using bovine serum albumin as standard.

Fibrinogenolytic activity

Fibrinogenolytic activity was assayed as described by [McKillop *et al.* \[1975\]](#), with some modifications. 50 μ L of bovine fibrinogen (1,5mg/ml PBS) were incubated with 5 μ g of Moozincin and the mixture was incubated at 37°C, pH 4-9, for different time intervals (1, 2, 3, 4, 5, 10 and 15 min). The reaction was stopped by the addition of an equal volume of a denaturing buffer containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10% β -mercaptoethanol. Reaction products were analyzed by 14% (w/v) SDS–PAGE.

Heat and Inhibitor effects on fibrinogenolytic activity

The thermal stability of the Moozincin was tested by incubating the enzyme in 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 8.0 for 15 min at varying temperatures (30–80°C). Aliquots of the enzyme were taken at the end of specified time intervals and assayed for fibrinogenolytic activity at 37°C. Inhibition of fibrinogenolytic activity was assayed

after pre-incubation of 5 µg of Moozincin in 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 8.0 for 30 min at 37°C containing one of the following inhibitors: 5 mM ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), 5 mM β-mercaptoethanol, 5 mM aprotinin, 5 mM benzamidine and 5 mM 1,10-phenantrolin. Fibrinogenolytic activity was assayed as described above.

Morphological alterations induced by Moozincin

Morphological alterations induced by Moozincin were assayed as described by [Costa *et al.* \[2010\]](#). Briefly, groups of four mice (18–20 g) were injected i.p. with 50 µg of crude venom or 50 µg of Moozincin, dissolved in PBS (100 µL). Control mice were injected with 100 µL of PBS under identical conditions. Twenty-four hours after injection, mice were killed by an overdose of ketamine/xylazine, and the heart, lung, liver and kidney were dissected out. For histological analysis, tissues were placed in 10% formaldehyde and processed routinely for embedding in paraffin. Thick sections (5 mm) were prepared and stained with hematoxylin-eosin (H-E) for light microscopic observation.

Histological examination of myonecrosis

Myonecrosis activity was assayed on the basis of the morphologic alterations induced by i.m. injections of Moozincin (50 µg/50µL) in the right gastrocnemius muscle of mice (18–22 g, n = 4). After 24 h, the animals were sacrificed by an overdose of ketamine/xylazine and a small section of the central region of the muscle was excised and soaked in fixing solution (10% formaldehyde in PBS, v/v). The material was then dehydrated by increasing concentrations of ethanol and processed for inclusion in paraffin. The resulting blocks were sliced in 5 µm thick sections, stained with 0.25% (w/v) hematoxylin–eosin and examined under a light microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

Bothrops envenoming is characterized by proteolytic, coagulant and hemorrhagic effects. In this work, the purification and partial characterization of a metalloprotease from the venom of *B. moojeni* are presented. Chromatography of *B. moojeni* venom on a DEAE-Sephacel column (Fig. 1.1A) resulted in the separation of eight protein fractions (peaks E1–E8). The proteins present in the E6 fraction showed substantial proteolytic activity towards azocasein and fibrinogen (data not shown). Further chromatography of the E6 protein fractions on a Sephadex G-75 column (Fig. 2.1B) resulted in the elution of four main peaks of proteins (peaks E6G1 – E6G4). The purity degree of the E6G2 fraction was confirmed by analytical reverse phase HPLC (data not shown), which indicated only one main fraction. This fraction was denoted Moozincin and showed fibrinogenolytic activity; no blood-clotting, phospholipase A₂ or hemorrhagic activities were detected. On SDS–PAGE gels under reduced conditions, the purified Moozincin migrated as a single protein band corresponding to an apparent molecular mass of 28 kDa. This molecular mass is similar to other snake venom metalloproteases (SVMPs) such as: BmooMP α -I (24,5 kDa) from *B. moojeni* venom (Bernardes et al., 2008); BnP1 (24 kDa) from *B. neuwiedi* [Baldo et al., 2008], BthMPm (23.5 kDa) [Gomes et al., 2009], among others. According to their molecular mass, Moozincin belongs to class PI metalloproteinase from SVMPs. These metalloproteinases class are not hemorrhagic or weakly hemorrhagic and have molecular masses of 20-30 kDa. SVMPs of the class P-I have been isolated from the venom of *B. neuwiedi* (Rodrigues et al., 2000), as example has BAP1 [Watanabe et al., 2003] and TM-3 [Huang et al., 2002].

The Moozincin showed high proteolytic activity on bovine fibrinogen. Fig. 2.2 shows that Moozincin degraded fibrinogen A α -chain after 2 min of incubation, while the B β -chain was completely degraded upon 10 min. The γ -chain of the molecule was not degraded at the same incubation time. Like other fibrinogenases from the venoms of *B. moojeni* (BthMP [Gomes et al., 2009] and BmooMP α -I [Bernardes et al., 2008]) Moozincin preferentially hydrolyzed the A α -chain followed by the B β -chain of fibrinogen. Moozincin differ from the proteases of *B. moojeni* (MSP1 and MSP2) [Serrano et al., 1993a, 1993b], because these proteases digested the γ -chain, which is not common to many snake venom proteases.

Based on the hydrolysis of the fibrinogen chains, fibrinogenolytic enzymes from snake venoms can be classified as α -, β - or γ -fibrinogenases. Our results suggest that Moozincin belongs to α -fibrinogenases class.

The stability and effect of inhibitors on the proteolytic activity was tested upon bovine fibrinogen. Moozincin stability, after preincubation at different temperatures and pH values, was temperature range from 30 to 80 °C (Fig. 2.2B) and higher at pH range from 4.0 to 11.0 (Fig. 2.2C). The enzymatic activity of Moozincin was strongly inhibited by EDTA, 1,10-phenanthroline and agent reducer β -mercaptoethanol. These results suggest that Moozincin belongs to the class of metalloproteases and the bonds disulfide are important for maintenance of your structure.

Snake venom metalloproteinases have been extensively studied and their effects associated with cellular morphologic alterations [Gay *et al.*, 2005; Bernardes *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2001]. Myonecrosis induced by Moozincin and *B. moojeni* venom injections (50 μ g) were observed and followed by histopathological analysis of injected muscle sections, which were fixed for light microscopic examination 24 hr after injection. Figure 2.3 shows light micrographs of sections of mouse gastrocnemius muscle after injection of crude venom (CD) and Moozincin (EF). The crude venom extensively altered cell morphology as denoted by disorganized myofibrils, abundant inflammatory infiltrate (mainly polymorphonuclear cell infiltration) and hemorrhage. In contrast, the Moozincin revealed low myotoxicity evidenced by hyaline degeneration and some leukocyte infiltrate. Figure 2.4 shows light micrographs of section of mouse pulmonary tissue after injection of *B. moojeni* crude venom (CD) and Moozincin (EF). In the lung, both crude venom and Moozincin caused pneumonitis evidenced by thickening of the alveolar septa due to prominent infiltrate of polymorphonuclear and mononuclear cells. In addition, Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) look increased, corroborate the inflammatory effect of the samples. *B. moojeni* crude venom also caused drastic cell alterations in liver, kidney and heart (data not shown). However, in these tissues the Moozincin not induced cell alterations (data not shown). Our issues suggests than Moozincin presented low systemic toxicity when compared with crude venom. Thus, it is demonstrated that Moozincin not contribute markedly to the systemic toxicity of the bothropic envenomation. Validate this hypothesis with ultrastructural histological analyses and others, the Moozincin can be used pharmacological model in therapeutic studies.

In conclusion, we have purified a metalloproteinase, Moozincin, with azocaseinolytic and fibrinogenolytic activities, from *B. moojeni* venom. The properties of Moozincin indicate that this protein probably is a α -fibrinogase and belongs to class P-I of SVMs.

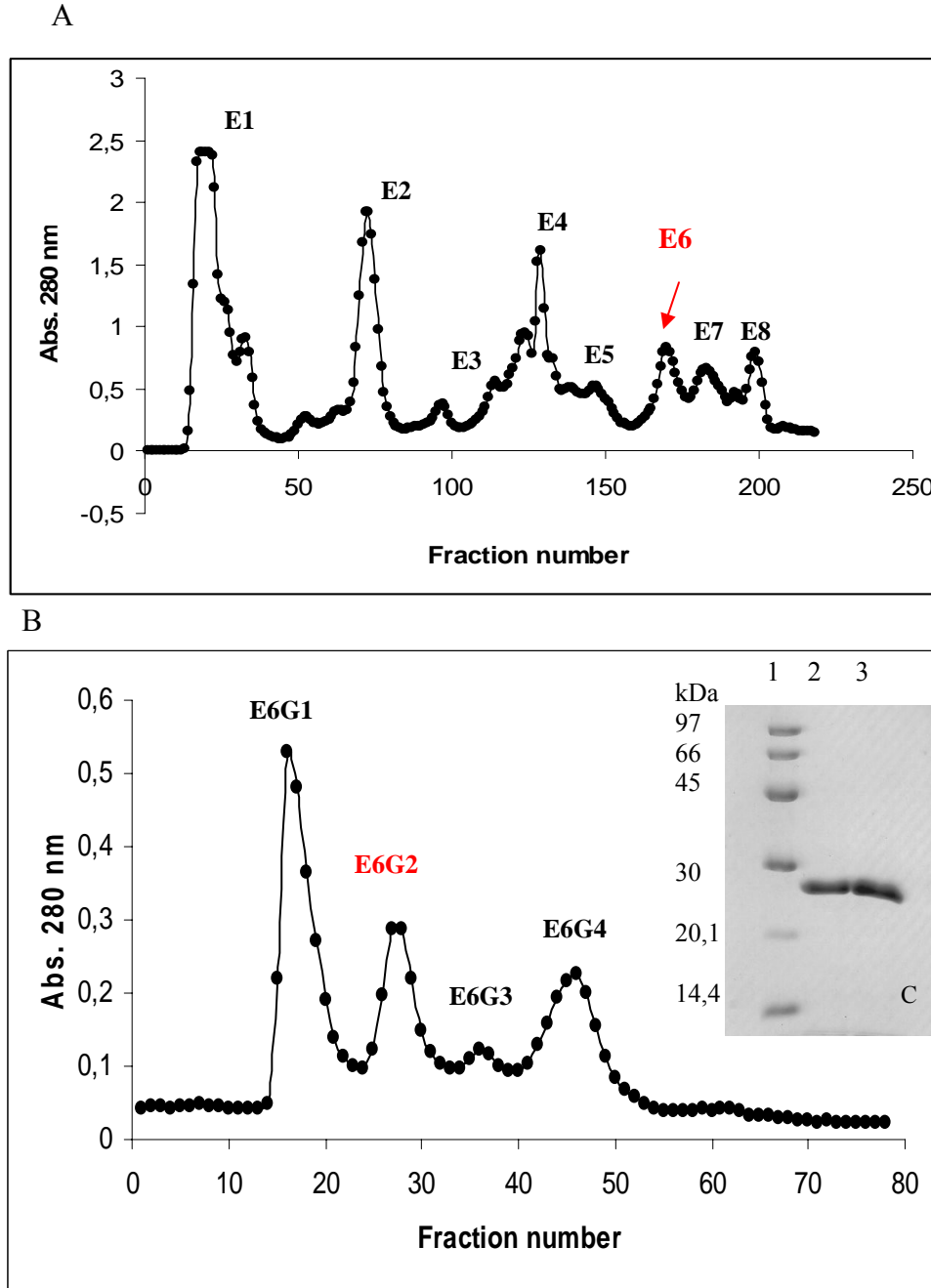


Figure 2.1. Purification of Moozincin from *Bothrops moojeni* venom: (A) Separation on DEAE-Sephacel: Crude venom from *Bothrops moojeni* (200 mg) was applied on the column (1.7 x 15 cm) and elution was carried out at a flow rate of 20 mL/h with ammonium bicarbonate gradients buffer, pH 7.8, from 0,05 to 0,3 M. (B) Separation on Sephadex G-75: The active fraction (E6) was applied on the column (1.0 x 100 cm) and

elution with 50mM ammonium bicarbonate buffer at pH 7,8 was achieved at a flow rate of 20 mL/h. (C) SDS-PAGE 14 % under reduction conditions (w/v), Tris- glycine buffer, pH 8.3, and 20 mA. Lines: (1) molecular mass markers (fosforilase b 97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) and α -lactoalbumina (14.400); (2) Moozincin reduced; (3) Moozincin non reduced.

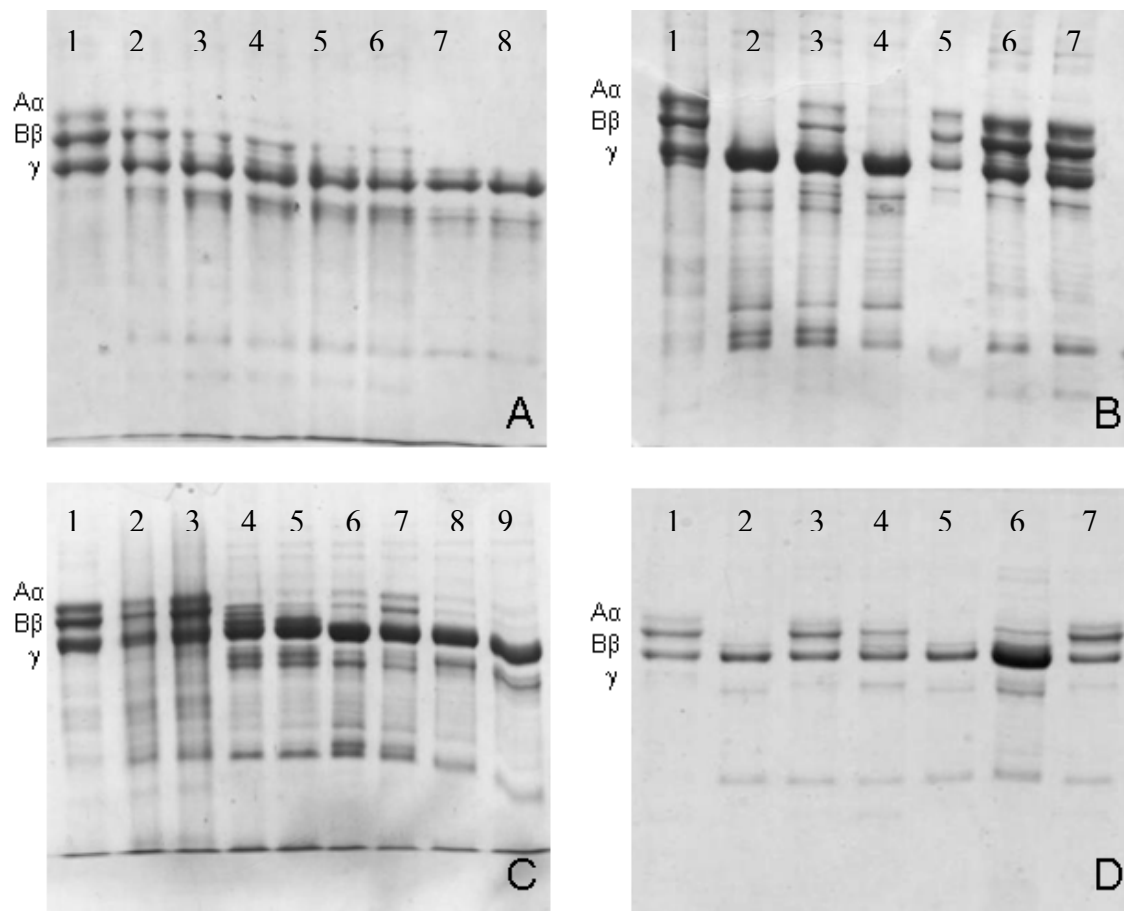


Figure 2.2. Proteolysis of bovine fibrinogen by Moozincin. Lanes: 1-Control incubated without enzyme for 90 min; (A): 2-8: control incubated with Moozincin for 1, 2, 3, 4, 5, 10 and 15 min, respectively. (B): Effect of the temperature on the stability of the Moozincin. Lanes: 1-Control fibrinogen incubated without Moozincin for 15 min; 2-7: control fibrinogen incubated with Moozincin for 15 min at 30, 40, 50, 60, 70 and 80°C, respectively. (C): Effect of the pH on the stability of the Moozincin. Lanes: 1-Control fibrinogen incubated without Moozincin for 60 min; 2-9: control fibrinogen incubated with Moozincin for 15 min in pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11 respectively. (D): Proteolysis of bovine fibrinogen by the Moozincin and effect of inhibitors. Lanes: 1-Control fibrinogen incubated without Moozincin for 15 min; 2- control fibrinogen

incubated with Moozincin for 15 min; 3-7: fibrinogen after incubation with Moozincin and 5 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol, 5 mM aprotinin, 5 mM benzamidine and 5 mM 1,10-phenantrolin for 15 min, respectively.

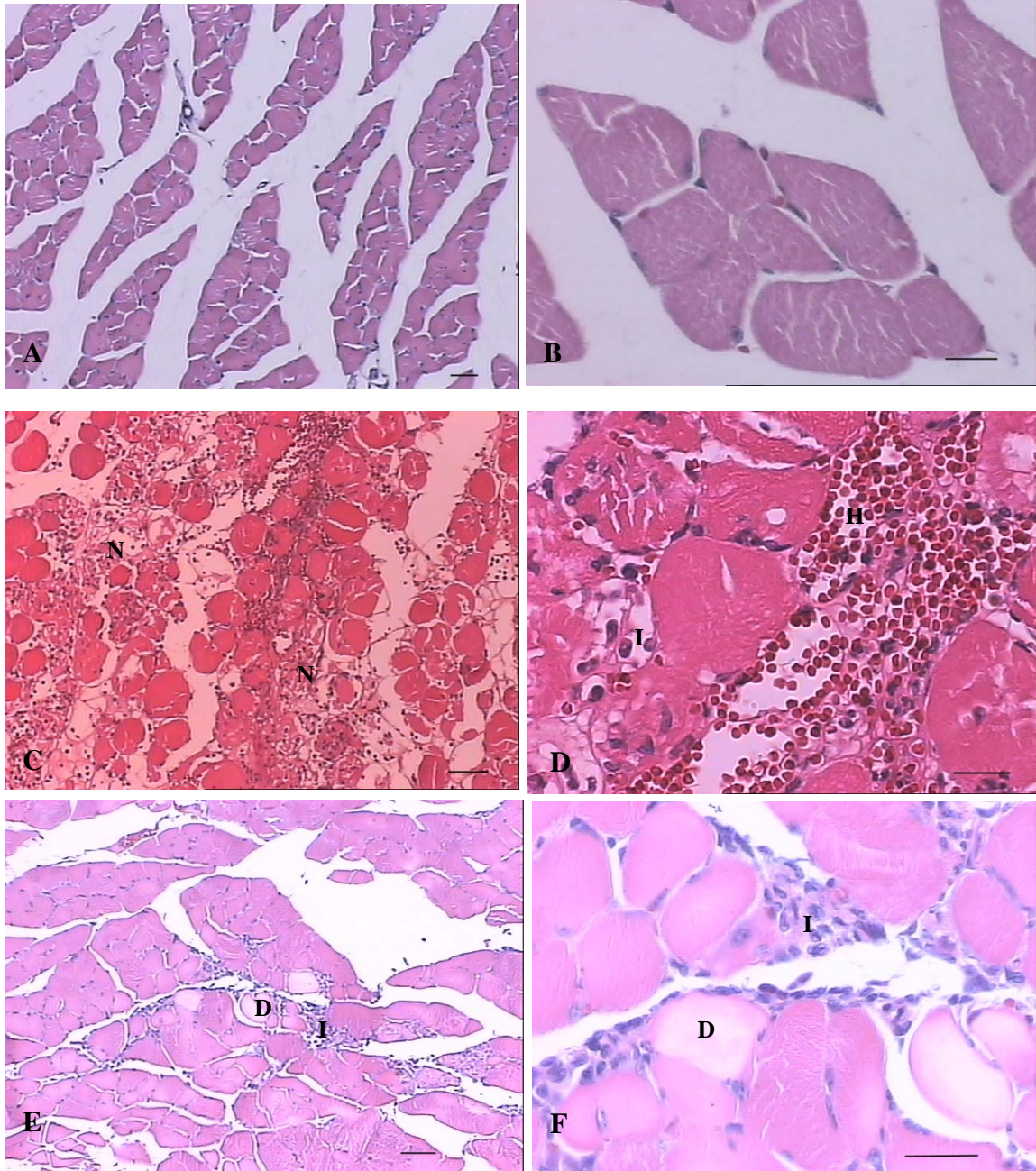


Figure 2.3: Light micrographs of sections of mouse gastrocnemius muscle 24 h after injection of 50 μ g of *B. moojeni* crude venom and 50 μ g of Moozincin/100 μ L saline, stained with hematoxylin-eosin. (A) and (B): Control mice were injected with saline: normal integer fibers are seen. (C) and (D): *B. moojeni* crude venom: notice the presence of a drastic myonecrosis, inflammatory infiltrate, hemorrhage and extensive cell destruction. (E) and (F): Moozincin: showing low muscle fibers degeneration,

inflammatory infiltrate and hyaline degeneration. Letters indicate the presence of necrosis (N), inflammatory infiltrate (I), hemorrhage (H) and hyaline degeneration (D). Scale bar = 100 μm (A,C,E); Scale bar = 50 μm (B,D,F).

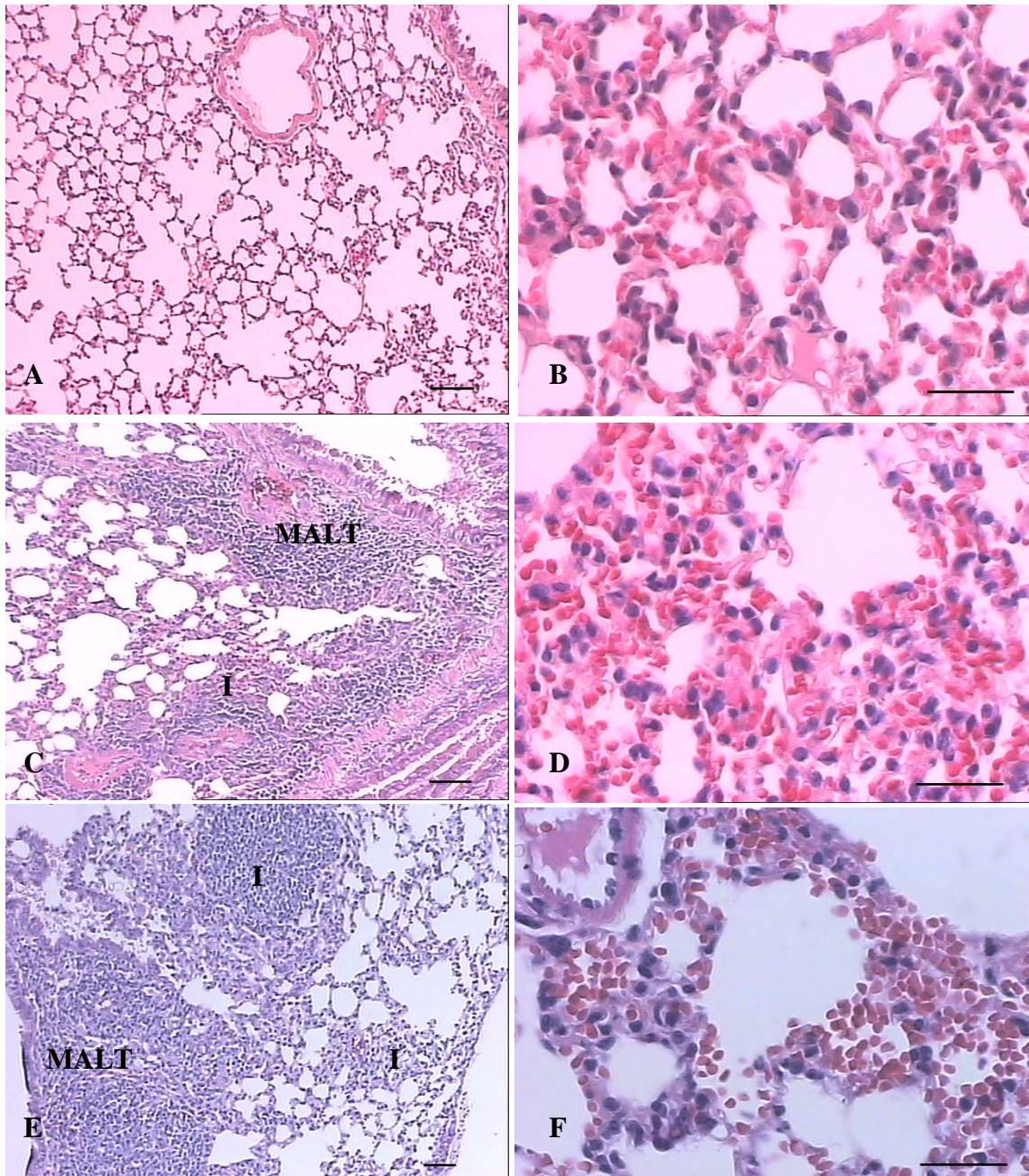


Figure 2.4: Light micrographs of section of mouse pulmonary tissue 24 h after i.p. injection of 50 μg of *B. moojeni* crude venom and 50 μg Moozincin/100 μL saline, stained with hematoxylin-eosin. (A) and (B): Control: normal pulmonary tissue. (C), (D) and (E), (F): *B. moojeni* crude venom and Moozincin, respectively: note pneumonitis evidenced by thickening of the alveolar septa and increase of MALT, due

to prominent infiltrate of polymorphonuclear and mononuclear cells. Letter indicates the presence of abundant inflammatory infiltrate (I), light micrographs D and F shows thickening of the alveolar septa.

REFERENCES

BALDO C, TANJONI I, LEON IR, BATISTA IFC, DELLA-CASA MS, CLISSA PB, WEINLICH R, LOPES-FERREIRA M, LEBRUN I, AMARANTE-MENDES GP, RODRIGUES VM, PERALES J, VALENTE RH, MOURA-DA-SILVA AM. BnPI, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon*, 51, 54-65, 2008.

BERNARDES CP, SANTOS-FILHO NA, COSTA TR, GOMES MSR, TORRES FS, COSTA J, BORGES MH, RICHARDSON M, DOS SANTOS DM, PIMENTA AMC, HOMSI-BRANDEBURGO MI, SOARES AM, OLIVEIRA F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, 51, 574–584, 2008.

BJARNASON JB, FOX JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol.*, 62, 325-372, 1994.

BJARNASON JB, FOX JW. Snake venom metalloproteinases: reprotolysins. *Methods Enzymol.*, 248, 345-368, 1995.

COSTA JO, FONSECA KC, MAMEDE CCN, BELETTI ME, SANTOS-FILHO NA, SOARES AM, ARANTES EC, HIRAYAMA SNS, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS, FONSECA F, HENRIQUE-SILVA F, PENHA-SILVA N, OLIVEIRA F. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon*, 55, 1365–1377, 2010.

FOX JW, SERRANO SMT. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases, *Toxicon*, 45, 969 - 985, 2005.

GAY CC, LEIVA LC, MARUNAK SL, TEIBLER P, ACOSTA DE PÉREZ O. Proteolytic edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon*, 46, 546-554, 2005.

GOMES MSR, MENDES MM, OLIVEIRA F, ANDRADE RM, BERNARDES CP, HAMAGUCHI A, ALCÂNTARA TM, SOARES AM, RODRIGUES VM, HOMSI-

BRANDEBURGO MI. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, 53, 24–32, 2009.

HITE LA, JIA LG, BJARNASON JB, FOX JW. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 308, 182-191, 1994.

HUANG KF, CHIOU SH, KO TP, YUANN JM., WANG AH. The 1.35Å structure of cadmium-substituted TM-3, a snake-venom metalloproteinase from Taiwan habu: elucidation of a TNF alpha-converting enzyme-like active-site structure with a distorted octahedral geometry of cadmium. *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.*, 58, 1118-1128, 2002.

ITZHAKI RF, GILL DM. A microbiuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.*, 9, 401- 410, 1964.

KINI RN, EVANS HJ. Structural Domains in Venom Proteins: Evidence that Metalloproteinases and Nonenzymatic Platelet Aggregation Inhibitors (Disintegrins) from Snake Venoms Are Derived By Proteolysis from a Common Precursor. *Toxicon*, 30, 265-293, 1992.

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

LAING GD, MOURA-DA-SILVA AM. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon*, 45, 987-996, 2005.

MARCUSSI S, BERNARDES CP, SANTOS-FILHO NA, MAZZI MV, OLIVEIRA CZ, IZIDORO LFM, FULY AL, MAGRO AJ, BRAZ ASK, FONTES MRM, GIGLIO JR, SOARES AM. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides*, 28, 2328-2339, 2007.

MCKILLOP C, EDGAR W, PRENTICE CR, FORBES CD. Soluble fibrin complex production and proteolysis during ancrod therapy. *Scott Med. J.*, 20, 139-140, 1975.

MOURA DA SILVA AM, LAING GD, PAINE MJI, DENNISON JMTJ, POLITI V, CRAMPTON JM, THEAKSTON RDG. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metal-loproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur. J. Immunol.*, 26, 2000-2005, 1996.

OLIVEIRA RB. Fatores epidemiológicos e clínicos associados à incoagulabilidade sanguínea no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. *Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia*, 2009.

RODRIGUES VM, SOARES AM, GUERRA-SÁ R, RODRIGUES V, FONTES MRM, GIGLIO JR. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, 381, 213-224, 2000.

RODRIGUES VM, SOARES AM, ANDRILAO-ESCARSO SH, FRANCESCHI AM, RUCAVADO A, GUTIERREZ JM, GIGLIO JR. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie*, 83, 471-479, 2001.

RUCAVADO A, ESCALANTE T, TEIXEIRA CF, FERNANDES CM, DIAZ C, GUTIERREZ JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators Inflamm.*, 11, 121-128, 2002.

SANCHEZ EF, SCHNEIDER FS, YARLEQUE A, BORGES MH, RICHARDSON M, SUELY G, FIGUEIREDO SG, EVANGELISTA KS, EBLE A. J. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. *Arch. Biochem. Biophys.*, 496, 9-20, 2010.

SERRANO SMT, MATOS NFC, MANDELBAUM FR, SAMPAIO CAM. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom. I Isolation and activity of two serine proteinases MSPI and MSPII on synthetic substrates and on platelet aggregation. *Toxicon*, 31, 471, 1993a.

SERRANO SMT, SAMPAIO CAM, MANDELBAUM FR. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom. II Isolation of the metalloproteinase MPB.

Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB,MSPI and MSPII. *Toxicon*, 31, 483, 1993b.

SIMON-SANCHEZ J, SCHOLZ S, FUNG HC, MATARIN M, HERNANDEZ D, GIBBS JR, BRITTON A, DE VRIEZE FW, PECKHAM E, GWINN-HARDY K, CRAWLEY A, KEEN JC, NASH J, BORGAONKAR D, HARDY J, SINGLETON A. Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals. *Hum. Mol. Genet.*, 16, 1-14, 2007.

WATANABE L, SHANNON JD, VALENTE RH, RUCAVADO A, ALAPE-GIRON A, KAMIGUTI AS, THEAKSTON RD, FOX JW, GUTIERREZ JM, ARNI RK. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Sci.*, 12, 2273-2281, 2003.