



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

Moojenina: Nova enzima coagulante isolada da peçonha de
Bothrops moojeni - Purificação e Caracterização.

Estudante: **Nadia Cristina Gomes de Moraes**

Uberlândia

2011



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

Moojenina: Nova enzima coagulante isolada da peçonha de
Bothrops moojeni - Purificação e Caracterização.

Estudante: **Nadia Cristina Gomes de Moraes**
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 Bioquímica)

Uberlândia

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M827m Morais, Nadia Cristina Gomes de, 1984-
 Moojenina [manuscrito] : Nova enzima coagulante isolada da peçonha
 de Bothrops moojeni - Purificação e Caracterização / Nadia Cristina Gomes
 de Moraes. – 2011.

55 f. : il.

Orientador: Fábio de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Cobra venenosa – Veneno - Teses. 2. Bothrops – Teses. 3. Enzimas
proteolíticas – Teses. 4. Jararaca (Cobra) – Veneno - Teses. I. Oliveira,
Fábio de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 615.99:598.126

Agradecimentos

Mais um obstáculo vencido, e neste momento eu tenho muito a agradecer...

Agradeço a Deus, pela força e coragem para derrubar obstáculos e hoje alcançar um sonho e por sempre me guiar pelo caminho do bem.

Aos meus pais, agradeço pela educação e por todo apoio sobre minhas decisões, por toda confiança e investimento em meus sonhos, pelas palavras certas nos momentos de decepção e pelo sorriso límpido nas horas de sucesso.

Aos meus irmãos, Karla e Mário Jr., pela amizade, carinho e pela tolerância em meus momentos de estresse, vocês são amigos para toda vida.

Aos meus familiares e amigos, agradeço por toda torcida e apoio durante toda essa caminhada. Pelos momentos de alegrias e aconselhamentos.

Agradeço também a todos os colegas do laboratório de biofísica: Carlinha, Kelly, Mayara, Saulo, Moline, Thalita, Thaisa, Bruna e Ana Luiza, que entre um experimento e outro, tornaram os dias no laboratório mais divertidos. E também por todo apoio do laboratório de Bioquímica, que foi uma parceria sempre muito boa.

Aos melhores orientadores que eu podia ter, professor Dr.Fábio que além de orientar é sempre um grande amigo, que sempre acha uma luz no fim do túnel, e a Dra Veridiana que me acolheu de braços abertos no seu grupo de orientados, sempre apoiando com novas idéias.

Não poderia deixar de agradecer àqueles, que nos bastidores também foram realizadores deste trabalho: todos os técnicos e professores, e à Bethy.

Ao meu namorado Alexsandro, por todo apoio, carinho e compreensão... Obrigada meu anjo!

A todos que de alguma forma me ajudaram...

MUITO OBRIGADA!!!!

Apoio

**COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL
SUPERIOR - CAPES**



**CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E
TECNOLÓGICO - CNPQ**



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 I [Fundamentação teórica]	02
1- Serpentes	03
2- Acidentes ofídicos	06
3- Peçonha Botrópica	08
3.1- Metaloprotease de peçonhas ofídicas (SVMPs)	09
4- Coagulação sanguínea	13
4.1- Processo de coagulação sanguínea	14
4.2- Influência da peçonha ofídica sobre a hemostasia	16
Referências	18
Capítulo II [Trabalho experimental].....	25
Abstract	27
Resumo	28
1- Introduction.....	29
2- Materials and methods	30
2.1- Materials	30
2.2- Animals	31
2.3- Isolation of Moojenin.....	31
2.4- Protein analyses	31
2.5- N-terminal sequencing	31
2.6- Fibrinogenolytic activity	32
2.7- Heat stability	32
2.8- Determination of procoagulant activity	32
2.9- Enzyme inhibitors	33
2.10- Defibrinating activity.....	33
2.11- Histological analysis.....	33
3- Results and discussion.....	34
References	45

Lista de abreviaturas

AMBIC	Tampão bicarbonato de amônio
Bis-Acrilamida	N, N'-metileno-bis-acrilamida
DEAE	Grupo dietilaminoetil
DFP	diisopropilfluorofosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PB	Peçonha bruta
PMSF	fenilmetilsulfonilflúor
PTH	feniltiohidantoína
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SINAN:	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil etilenodiamina
TRIS	Tris-[hidroximetil]-aminometano
i.m	intramuscular
i.p	intraperitonal

Lista de Figuras

	Páginas
Figura 1.1	Tipos de dentição encontrados em serpentes peçonhentas..... 03
Figura 1.2	Representantes de serpentes brasileiras da família Viperidae..... 04
Figura 1.3	Representante da espécie <i>Bothrops moojeni</i> 06
Figura 1.4	Análise proteômica e transcriptômica de peçonha de serpentes..... 09
Figura 1.5	Figura esquemática das classes de SMVP..... 10
Figura 1.6	Nova classificação das metaloproteases de peçonhas de serpentes..... 11
Figura 1.7	Cascata de coagulação e formação de fibrina pelas vias intrínseca e extrínseca..... 14
Figura 1.8	Estrutura do fibrinogênio..... 16
Figura 2.1	Purificação Moojenina..... 40
Figura 2.2	Comparação da sequencia de aminoácidos da Moojenina com outras metaloproteases da peçonha de diferentes serpentes..... 41
Figura 2.3	Análise SDS-PAGE da atividade da Moojenina sobre o fibrinogênio bovino..... 42
Figura 2.4	Micrografia do músculo gastrocnemius 24 h após a injeção i.m de 50 µg de PB de <i>B. moojeni</i> e 50 µg de Moojenina em 50 µL de salina e coloração com hematoxilina-eosina e Micrografia de tecido hepático de camundongos 24 h após injeção i.p de 50 µg de PB de <i>B. moojeni</i> e 50 µg Moojenina em 100 µL de salina e coloração com hematoxilina-eosina 43

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1 Exemplos de metaloproteases isoladas de peçonha botrópica.....	13
Tabela 2 Comparação da atividade procoagulante da peçonha bruta com a Moojenina.....	44
Tabela 3 Efeito de inibidores protéicos sobre atividade coagulante da Moojenina	44

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.

Com objetivo de purificar uma metaloprotease da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* e caracterizá-la quanto a aspectos bioquímicos e funcionais, foram seguidos os seguintes passos:

- 1) Avaliação de seu grau de pureza e de sua massa molecular;
- 2) Determinação de sua atividade proteolítica em relação ao fibrinogênio bovino;
- 3) Análise da estabilidade da protease frente à temperatura, pH e ação de alguns inibidores enzimáticos;
- 4) Sequenciamento do fragmento N-terminal;
- 5) Caracterização de sua atividade hemorrágica, coagulante, anticoagulante e análise histopatológica

Todos os pontos foram alcançados e o objetivo realizado mediante purificação da protease denominada Moojenina.

O capítulo 1 mostra uma contextualização de todo o trabalho com referência em âmbito internacional, mostrando a importância da serpente da espécie *Bothrops moojeni*, caracterização e isolamento de proteases da peçonha para uso terapêutico. As referências utilizadas neste capítulo foram buscadas nos serviços de indexação 'SciELO', 'Web of Knowledge' e 'Scopus'.

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

Capítulo I

Fundamentação teórica

1- Serpentes

As serpentes, cladisticamente, são pertencentes ao filo Chordata, sub filo Vertebrata, classe Reptilia, ordem Squamata, subordem Serpentes. Este é o segundo filo mais diversificado dos répteis, e é composto por aproximadamente 2700 espécies (POUGH *et al.*, 1999). 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).

Frey Vogel e Perret (1973) definiram que as serpentes peçonhentas são aquelas que produzem substâncias tóxicas para outros organismos. Essas substâncias são produzidas em glândulas bucais modificadas, e são inoculadas na vítima por meio de presas, localizadas na maxila e ligadas à glândula por um ducto.

As serpentes da família Viperidae possuem uma dentição denominada solenóglifa (do grego *solenos*, móvel, e *glifos*, canal) (**Figura 1.1A**), caracterizada por apresentar presas canaliculadas e curvadas, localizadas na porção anterior da maxila e que se projetam para fora no momento do ataque. Essas características garantem maior eficiência na inoculação da peçonha. As serpentes da família Elapidae são proteróglifas (do grego *protero*, anterior, e *glifos*, canal) (**Figura 1.1B**). Possuem um par de dentes pequenos, bem sulcados e fixos na porção anterior da boca, os quais limitam a injeção da peçonha.



A



B

Figura 1.1: Tipos de dentição encontrados em serpentes peçonhentas. Em (A), dentição solenóglifa (família Viperidae), que permite injeção direta da peçonha na vítima. Em (B), dentição proteróglifa (família Elapidae), menos eficiente na inoculação da peçonha. Fontes: http://conhecendoserpentes.blogspot.com/2009_11_01_archive.html [acesso em 01/02/2011]

<http://www.abrigodosebichos.com.br/Forum/Topico214.htm> [acesso em 01/02/2011]

A família Viperidae possui cerca de 250 espécies, dentre elas, 28 são encontradas no Brasil. Os gêneros mais comuns são *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops*, *Caudisona*, *Lachesis* e *Rhinocerothis* (Bérnils, 2010). Elas são facilmente identificadas pela cabeça triangular, recoberta por pequenas escamas de aspecto similar às do corpo e pela presença de fosseta loreal, localizada na região entre o olho e a narina (FUNASA, 2001). Os principais representantes desta família são as jararacas, surucucus e cascáveis (**Figura 1.2**).

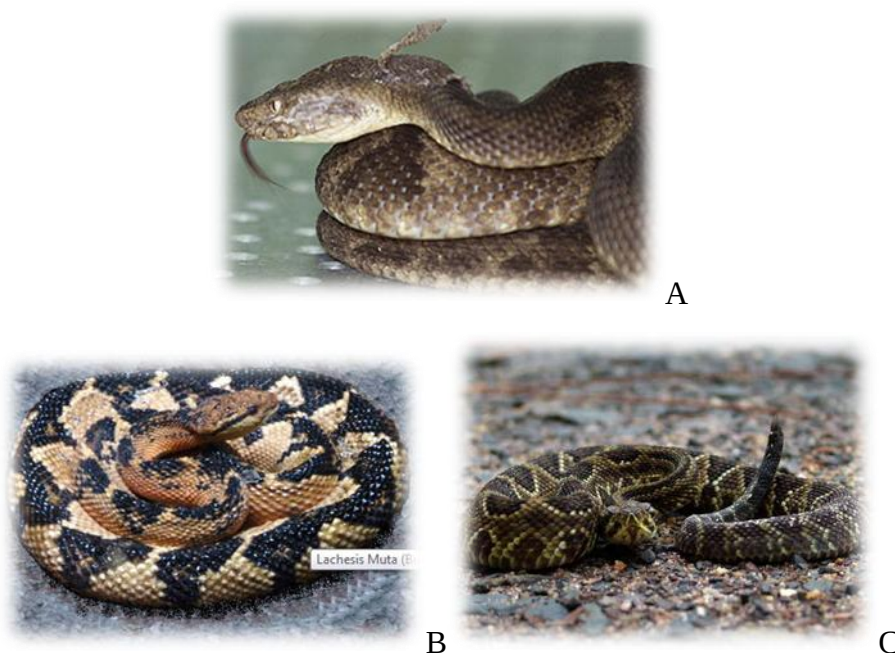


Figura 1.2: Representantes de serpentes brasileiras da família Viperidae. (A) representado pela espécie *Bothrops jararaca*, (B) *Lachesis muta* e (C) *Crotalus durissus*.

Fontes: <http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/773230-butantan-desvenda-hemorragia-da-picada-de-jararaca.shtml> [acesso em 01/02/2011]

<http://www.poisonexport.com/ing.php> [acesso em 01/02/2011]

<http://visaoglobal.org/2008/04/27/toxina-da-cascavel-pode-atuar-como-tnico-muscular/> [acesso em 01/02/2011]

O gênero *Bothrops* é um dos mais abundantes no Brasil, possuindo cerca 30 espécies distribuídas por todo país. Popularmente são chamadas de jararaca, jararacuçu, caicara, dentre outras denominações. Frequentemente são encontradas na zona rural e periferia de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde tenha facilidade para proliferação de roedores. São serpentes de

hábitos noturnos ou crepusculares, e ao sentirem-se ameaçadas, podem ser agressivas, deferindo botes de forma silenciosa (Guia de Vigilância Epidemiológica – FUNASA, 1998).

As espécies desse grupo, mais significativas para a saúde pública são *Bothrops atrox* (LINNAEUS, 1758), *Bothrops moojeni* (HOGE, 1966), *Bothrops jararacussu* (LACERDA, 1884), *Bothrops leucurus* (WAGLER 1824), *Bothropoides jararaca* (WIED, 1824), *Bothropoides neuwiedi* (WAGLER, 1824), *Bothropoides erythromelas* (AMARAL, 1925) e *Rhinocerophis alternatus* (DUMÉRIL, BIBRON e DUMÉRIL 1854) (MELGAREJO, 2003).

Um trabalho realizado por Fenwick e colaboradores (2009) fez uma reclassificação do gênero *Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias* baseado em evidências moleculares e morfológicas e alterou o nome de diversas espécies. Segundo essa nova classificação, foi criado um novo gênero o qual inclui as espécies: *Bothropoides alcatraz*, *Bothropoides diporus*, *Bothropoides erythromelas*, *Bothropoides insularis*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides lutzi*, *Bothropoides mattogrossensis*, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothropoides pubescens*, *Bothropoides pauloensis* e *Bothropoides marmoratus*.

A serpente *Bothrops moojeni*, descrita por Hoge (1965), é a principal serpente encontrada no cerrado brasileiro, distribuindo-se desde o Paraná até o Maranhão. Essas serpentes são caracterizadas pela facilidade de adaptação a ambientes modificados, pelo porte avantajado, (cerca de 1,5m de comprimento), e pelo comportamento agressivo (FUNASA, 2001) (**Figura 1.3**). Apresentam grande variação da tonalidade numa mesma ninhada (polimorfismo). A fêmea apresenta a cauda mais curta que a do macho. Alimenta-se de pequenos mamíferos, aves, lagartos, serpentes e anfíbios. 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 (CEMIG, 2003).



Figura 1.3: Foto de um representante da espécie *Bothrops moojeni*

Fonte: <http://portaldoprofessor.mec.gov.br/fichaTecnicaAula.html?aula=1879> [acesso em 01/02/2011]

2- Acidentes Ofídicos

Desde 1988/89 a notificação dos acidentes ofídicos no Brasil passou a ser obrigatória. Estes dados são importantes, pois trata-se de um importante problema de saúde pública, especialmente em regiões tropicais do mundo (PINHO e PEREIRA, 2001).

Os acidentes ofídicos podem causar desde arranhaduras superficiais ou perfurações profundas (com ou sem envenenamento), até dilaceração dos tecidos. Essa diferenciação na gravidade do acidente dependerá da espécie da serpente e as condições em que acontece o acidente (FUNASA, 2001). A letalidade dos acidentados varia em diferentes regiões do mundo (Fundação Nacional de Saúde, 1991).

O maior número de acidentes ofídicos acontece no período de março a setembro, principalmente na região meridional do país (Guia de Vigilância Epidemiológica – FUNASA, 1998). Cerca de 90% dos casos notificados são atribuídos às serpentes do gênero *Bothrops*, 9% ao gênero *Crotalus*, 0,5% ao gênero *Lachesis* e 0,5% provocados por *Micrurus*. Cerca de 70% dos pacientes são do sexo masculino e em 53% a faixa etária concentrou-se entre 15 e 49 anos (Guia de Vigilância Epidemiológica – FUNASA, 2001). A frequência de ataques nas pernas/pé é de 70%, antebraço/mão de 13%, todos decorrentes da não utilização de equipamentos mínimos de proteção individual: botas, sapatos, calças e luvas (Guia de vigilância epidemiológica- FUNASA, 2001).

O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) coloca o Brasil como país sul-americano com maior número de acidentes por ano. Somente em 2010, foram notificados 97.244 envenenamentos por animais peçonhentos, dentre os quais as serpentes contribuíram com 28.702 casos (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.

A soroterapia (específica ou polivalente) é o único tratamento disponível para os acidentes ofídicos. O soro antiofídico constitui-se na sua parte ativa de várias imunoglobulinas e é proveniente principalmente da purificação do soro de cavalos imunizados com a peçonha de determinado gênero de serpente (CASTRO, 2006). A ação do soro antiofídico baseia-se na formação do complexo antígeno/anticorpo (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.

A soroterapia, atualmente, é empregada em doses menores. Isso foi possível após estudos realizados com diferentes doses que apresentam resultados eficazes e, conseqüentemente, menos efeitos colaterais (SILVEIRA *et al.*, 1992). Outra medida que pode ser agregada é manter o membro afetado elevado e esticado. Além disso, pode-se utilizar analgésicos, hidratação, procurando manter o débito urinário entre 30 e 40 ml/h no adulto e de 1 a 2ml/kg/h na criança (ESTRADE *et al.*, 1989).

No caso de envenenamento botrópico é contra-indicado o uso de torniquete (Ministério da Saúde, 1999), pois neste caso são verificadas lesões locais como edema, sangramento e equimose (RIBEIRO *et al.*; 1988).

Lesões locais estão associadas à atividade proteolítica ou fosfolipásica, que determina edema inflamatório na região da picada (OLIVEIRA, 2009). Dentre as manifestações sistêmicas ocorrem: alteração da coagulação sanguínea, sangramento, choque e insuficiência renal (ETTINGER & FELDMAN, 1997; TOKARNIA E PEIXOTO, 2006). A mortalidade nos casos não tratados chega a 72% e nos casos tratados 12% (FUNASA, 2001).

3- Peçonha Botrópica

A produção e secreção de toxinas nas glândulas de peçonha ainda possuem mecanismos celulares desconhecidos. Sabe-se, apenas, que a produção da peçonha depende dos níveis protéicos armazenados no lúmen glandular. Acredita-se que a secreção de toxinas ocorre logo após a sua síntese, isso porque, a proporção de grânulos secretores nas células glandulares representa cerca de 4% do volume celular (JUNQUEIRA DE AZEVEDO; HO, 2002).

Vários fatores influenciam a quantidade de peçonha inoculada, como por exemplo, o porte, a idade e o metabolismo do animal. Há uma diferença entre a peçonha do filhote, que é predominantemente coagulante, e do adulto, com maior ação proteolítica (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

As enzimas proteolíticas presentes na peçonha de serpentes podem se auto hidrolisar. De fato, algumas proteínas são derivadas de grandes precursores que são hidrolisadas durante a formação da peçonha. Esta atividade proteolítica endógena aumenta a variabilidade das toxinas, o que permite diferenças entre indivíduos da mesma espécie (SOUSA *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2006).

Daltry e col. (1996) descrevem que a presença de determinados componentes da peçonha de uma mesma espécie de serpentes depende da variação geográfica em que estão submetidas, em associação com a dieta utilizada por elas.

A variedade dos componentes da peçonha é responsável por conduzirem alterações hemostáticas e hemorragias frequentemente diagnosticadas após o envenenamento. Acredita-se que esses processos são parte de uma estratégia que as serpentes utilizam para imobilizar vítimas, entretanto, podem também contribuir para aumentar a permeabilidade do tecido alvo para outros componentes da célula (MARSH; WILLIAMS, 2005).

Proteínas e enzimas como fosfolipases A₂, hialuronidases, L-amino-oxidases, metaloproteases e serinoproteases compõem cerca de 90% do peso seco das peçonhas de serpentes. 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).

3.1- Metaloproteases de peçonhas ofídicas (SVMPs)

Estudos recentes do proteoma e transcriptoma estimaram que a maioria das peçonhas do gênero *Bothrops* é composta por pelo menos 32% de enzimas proteolíticas dependentes de íons metálicos denominadas metaloproteases (SVMPs). A Fig. 1.4 mostra a análise proteômica e transcriptômica da serpente *B. jararaca* (FOX *et al.*, 2006), o que sugere a grande importância destas enzimas no envenenamento.

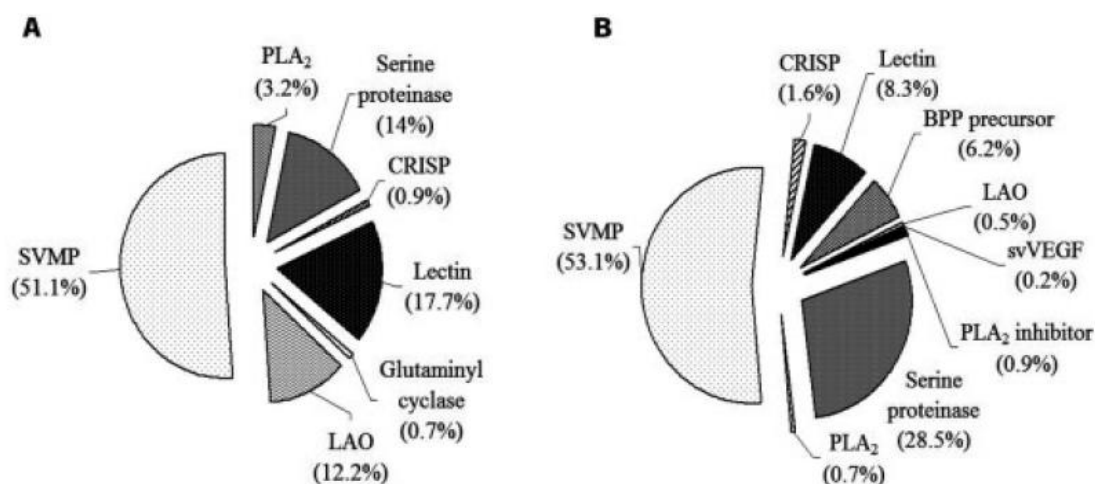


Figura 1.4: Análise proteômica e transcriptômica de peçonhas de serpente. (A) Composição protéica determinada por proteômica da peçonha de *Bothrops jararaca*. (B) composição da peçonha de *Bothrops jararaca* determinada por transcriptoma. (Fox *et al.*; 2006).

A estrutura e a função de proteinases zinco-dependentes das peçonhas de serpentes Viperidae vêm sendo investigadas a fim de compreender seu papel no envenenamento e conseqüentes patologias (TAKAHASHI T & OSAKA A, 1970). Bjarnason e Fox (1994) classificaram as SVMPs de acordo com sua massa molecular e sua atividade hemorrágica em PI, PII, PIII e PIV. As metaloproteases da classe PI são aquelas com massa molecular em torno de 24 kDa e com pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. As SVMPs da classe PII, são proteases médias com domínio desintegrina contendo a sequência RGD. A classe PIII agrupa proteínas com massa molecular entre 55 kDa e 90kDa e são as mais potentes toxinas hemorrágicas. As metaloproteases com massa molecular de aproximadamente 95kDa com baixa atividade hemorrágica compõem a classe PIV.

Fox e Serrano (2005) propuseram uma classificação para SVMPs, como descrito na Fig. 1.5. Essa classificação baseou-se essencialmente sobre a presença ou ausência de vários domínios proteínase como observado através de cópias de mRNA e proteínas isoladas da peçonha.

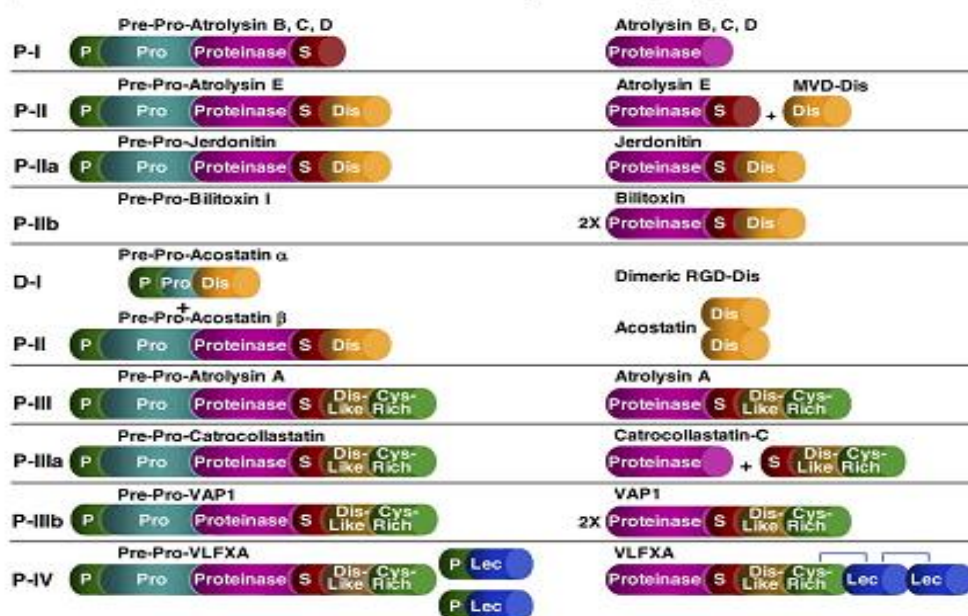


Figura 1.5: Figura esquemática das classes de SMVP. Pontos de interrogação (?) na figura indicam que o produto transformado não foi identificado no veneno [FOX e SERRANO, 2005].

Funcionalmente, as SVMPs exibem uma variedade de atividades biológicas, muitas das quais são tóxicas. Essa informação é resultado de uma variedade de investigações sobre proteoma e transcriptoma da peçonha de serpentes e suas glândulas (FOX e SERRANO, 2005).

Estima-se que cerca de 32% das proteínas que compõem a peçonha de viperídeos sejam SVMPs. Isto mostra o significativo potencial das metaloproteases nas patologias associadas ao envenenamento. (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2002; CALVETTE *et al.*, 2007). Existe, portanto, um mecanismo molecular complexo responsável por toda essa potencialidade (FOX e SERRANO, 2008).

Fox e Serrano (2008) propuseram uma nova classificação para as SVMPs. Essa classificação baseia-se na presença ou ausência de domínios não proteinase observados nos transcritos de mRNA (**Figura 1.6**).

A classe PI compreende SVMPs compostas somente de um domínio metaloprotease. Essas proteases apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, dependentes de suas respectivas estruturas primárias e terciárias. Classificaram como PIIa (antes PII) as enzimas 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 que possuem o domínio desintegrina sem ter o domínio metaloprotease, em muitos casos, o domínio desintegrina é separado do domínio metaloprotease por um processo proteolítico pós-traducional; a PIIIa para enzimas 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 cujas estruturas se organizam na forma de dímeros e PIIId que contém o domínio semelhante a lectina.

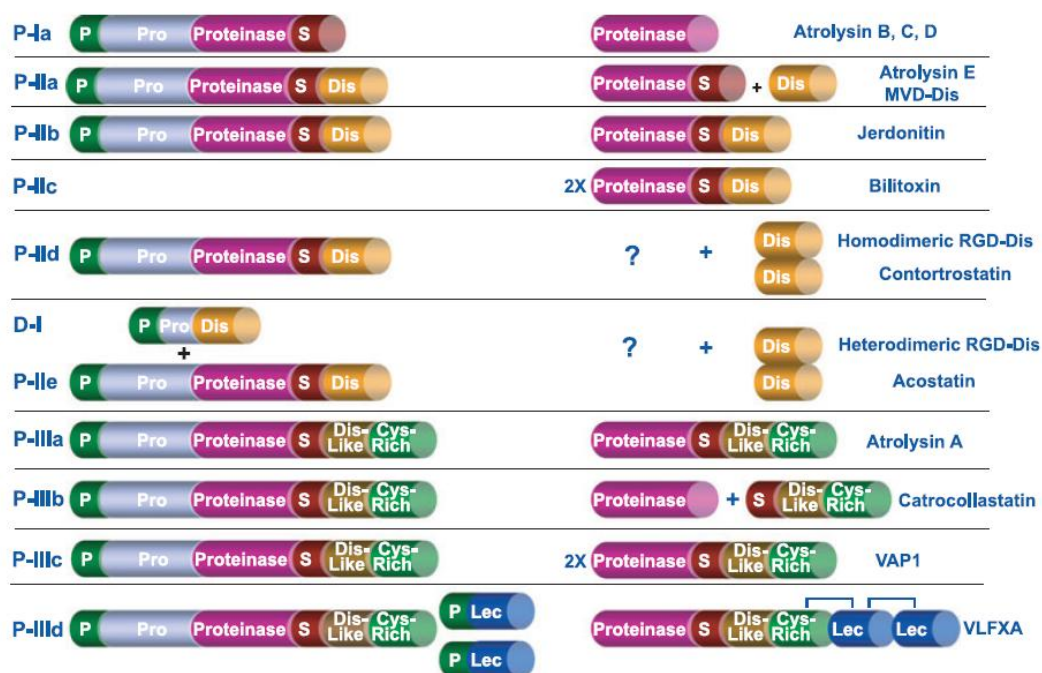


Figura 1.6: Classificação das SVMPs (FOX e SERRANO, 2008). P: peptídeo sinalizador; Pro: segmento da pró-proteína, removido durante sua ativação; S: sequência HEBXHXBGBXH; Dis: domínio desintegrina; Dis-like: domínio semelhante à desintegrina; Cys-rich: domínio rico em cisteína; Lec: lectina; (?): produto processado, mas não identificado na peçonha. FONTE: Fox e Serrano (2008).

As SVMPs compreendem um grupo de proteínas que são zinco-dependentes pertencem à família metzincina. Em comum, essas enzimas possuem um domínio de ligação de zinco com estruturas muito semelhantes entre si (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000). A família metzincina pode ser subdividida nas subfamílias repolisinas, serralisinas, astacinas e matrixinas (BODE *et al.*, 1993; RA e PARKS, 2007). O sítio ligante de zinco da família metzincina tem uma sequência de aminoácidos comum em todas as subfamílias (HEBXHXBGBXHZ) onde H representa a histidina; E, o ácido glutâmico; G, a glicina; B, um resíduo hidrofóbico; X, um aminoácido qualquer e Z, um aminoácido diferente entre as quatro subfamílias, mas conservado dentro das mesmas (MARKLAND, 1998).

As Matrixinas, metaloproteases de matriz extracelular (MMPs), podem apresentar-se ancoradas na superfície da célula, secretadas na forma de zimogênio [BODE *et al.*, 1993; RA e PARKS, 2007]. As ADAMs são compostas por mais de 30 membros identificados em várias espécies e caracterizados como glicoproteínas, ancoradas à membrana, com funções proteolíticas associadas a um domínio metaloprotease (BOHM *et al.*, 2005). O sítio ligante de zinco das proteases da família metzincina tem uma sequência de aminoácidos conservada (HEBXHXBGBXH). A remoção do zinco por agentes quelantes como EDTA ou 1,10-fenantrolina, que elimina a atividade biológica dessas enzimas (MARKLAND, 1998).

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 então transportada via grânulos de secreção para o lúmen (WARSHAWSKY *et al.*, 1973). No retículo endoplasmático as proteases são enoveladas e as pontes dissulfeto são formadas, oxidadas, glicosiladas e algumas sofrem multimerização, como em algumas desintegrinas diméricas (PIId e PIIE) (FOX e SERRANO, 2008).

As metaloproteases podem ser hemorrágicas ou não, isto está relacionado com proteólise de proteínas da matriz extracelular e de proteínas plasmáticas como o fibrinogênio (MARKLAND, 1998). As metaloproteases podem interagir com receptores específicos, como as desintegrinas. Esses efeitos podem levar a várias alterações fisiopatológicas, tais como: inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e hemorragias. A tabela 1 mostra algumas proteases de peçonhas botrópicas isoladas pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Biologia Celular e Molecular/ Área de Ciências Fisiológicas e Laboratório de Proteínas e Produtos Naturais/ INGEB).

Tabela 1: Exemplos de metaloproteases isoladas de peçonha botrópica

Metaloproteases	Espécie de serpente	Características	Referências
BthMP	<i>Bothrops moojeni</i>	Atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica	GOMES <i>et al.</i> , 2009
BaltMPII	<i>Bothrops alternatus</i>	Atividade α -fibrinogenolítica e incoagulável <i>in vivo</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2007
BmooMPα-I	<i>Bothrops moojeni</i>	Atividade fibrinolítica	BERNARDES <i>et al.</i> , 2008
MOO3	<i>Bothrops moojeni</i>	Atividade fibrinogenolítica	OLIVEIRA <i>et al.</i> ; 1999
BleucMP	<i>Bothrops leucurus</i>	Atividade fibrinogenolítica	GOMES <i>et al.</i> ; 2011

4- Coagulação Sanguínea

Um conjunto de ações coordenadas por uma série de sinais químicos interdependentes, mantêm um arrojado balanço entre a formação do coágulo sanguíneo até sua completa dissolução (fibrinólise). Esse equilíbrio interno é denominado de hemostasia (BRAUD *et al.*, 2000).

A coagulação ocorre pela ação de algumas serinoproteases sobre a cascata trombolítica. Algumas dessas moléculas conduzem a formação de trombina e consequentemente o coágulo. Este evento ocorre em uma superfície vascular e tem objetivo de prevenir perda de sangue e também para evitar formação de coágulos inapropriados (BODE, 1993).

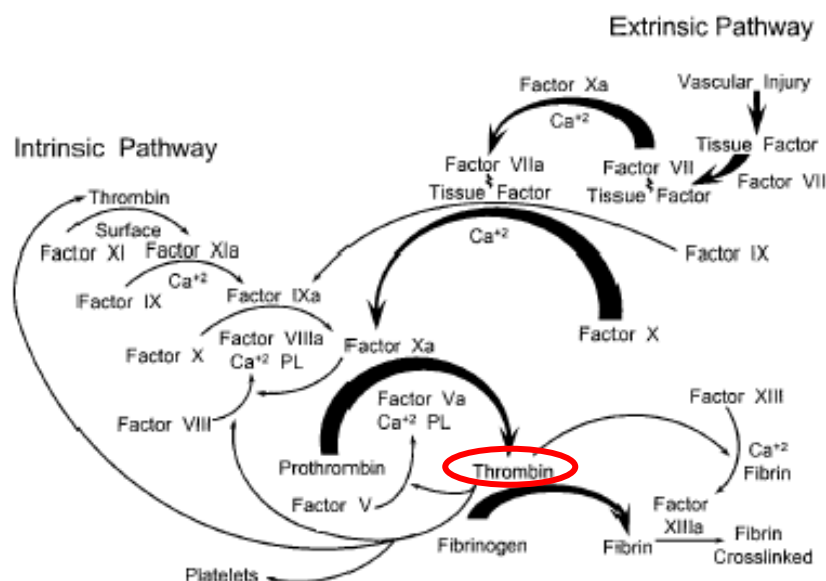


Figura 1.7: Cascata de coagulação e formação de fibrina pelas vias intrínseca e extrínseca (DAVIE, 2003).

4.1 - Processo de coagulação sanguínea

O processo de coagulação sanguínea pode ser resumido em 3 etapas que ocorrem concomitantemente.

A primeira etapa, denominada **Espasmo do Endotélio Vascular**, consiste na contração da musculatura lisa na região do vaso afetado, logo após a lesão, diminuindo, portanto, a área de escape sanguíneo (HARKER, 1997).

Em sequência, ocorre a formação do “tampão plaquetário”, no qual plaquetas discóides circulantes no sangue passam a interagir com proteínas subendoteliais como colágeno, fibronectina e vitronectina por meio de glicoproteínas de membrana e pelo complexo de glicoproteínas Ia/IIa da membrana plaquetária. Ocorre mudança conformacional das plaquetas e liberação de serotonina, ADP e tromboxanas A₂, que atraem outras plaquetas (KORNALIK, 1985).

Por fim, a **coagulação do sangue** acontece por meio de reações químicas, das quais a primeira é a conversão de fibrinogênio em uma rede insolúvel de fibrina. Esta, então, interage com as plaquetas aderidas ao tampão plaquetário, formando o coágulo (MACFARLANE, 1964). Nos mamíferos, a coagulação ocorre por duas vias

interligadas: a via intrínseca e a via extrínseca (DAVIE E RATNOFF, 1964) (**Figura 1.7**). Estas vias convergem com objetivo comum de ativar o fator X que culmina na formação do coágulo de fibrina (DAVIE, 2003).

O início da via intrínseca se dá pela fase de contato. Esta envolve o fator XII, pré-caliceína, HMWK (cininogênio de alto peso molecular) e fator XI. O processo ocorre independente de cálcio e fosfolípidos, entretanto é necessário uma superfície ativa carregada negativamente que desencadeia a união dos fatores de contato. O fator XII faz uma reação cíclica com a pré-caliceína e é então clivado transformando em sua forma ativa fator XIIa. Este converte fator XI em fator XIa e pré-caliceína em caliceína (DAVIE, 2003).

O fator IX, ligado ao cálcio e fosfolípidos 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 fosfolípidos e cálcio, que transformam a forma inativa do fator X em ativa (FXa).

Na via extrínseca, a ativação ocorre no momento da lesão. Nela, o fator VII se liga ao fator tecidual formando um complexo, ativando então o fator VII, por clivagem de um peptídeo interno. O fator VIIa ativa o fator X por quebrar um peptídeo na cadeia pesada e também, por proteólise limitada, acontecendo, então, a ativação do fator X.

Após formação do fator Xa nas duas vias, elas convergem para o ponto de produção de trombina. Neste momento, o fator Xa ativa o fator V e forma um complexo em presença de cálcio e fosfolípidos chamado de complexo ativador de protrombinase. Este complexo converte protrombina em trombina (DAVIE, 2003).

O fibrinogênio é uma molécula globular simetricamente dimérica. Cada unidade do dímero é composto de três cadeias designadas A α , B β e γ , 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) (**Figura 1.8**).

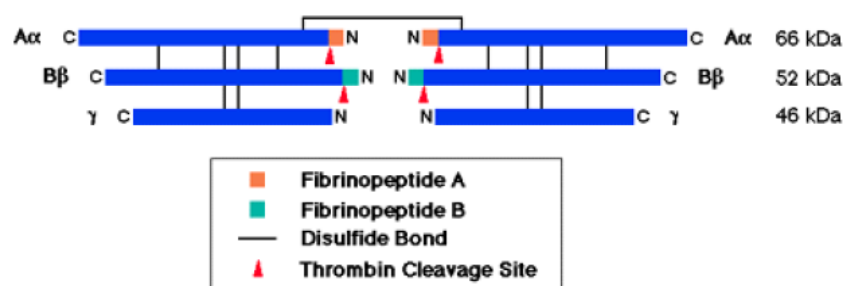


Figura 1.8: Estrutura do fibrinogênio, proteína plasmática dimérica formada por três pares de cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto.

Fonte: [HTTP://tollefsen.wustl.edu/projects/coagulation.html](http://tollefsen.wustl.edu/projects/coagulation.html) Acesso em 12/02/2011

Para quebrar a cadeia do fibrinogênio, a trombina se liga na região central da molécula clivando as ligações peptídicas arginina-glicina, removendo peptídeos N-terminais nas cadeias Aα e Bβ. Consequentemente, os fibrinopeptídeos A (FpA) composto de 16 resíduos de aminoácidos e os fibrinopeptídeos B (FpB) são liberados, formando então o monômero de fibrina, o qual denominamos de coágulo frouxo. Para fortalecer o coágulo uma transglutaminase (o fator XIII) é ativada por ação do cálcio e trombina, para introduzir ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina, formando um coágulo insolúvel e resistente à proteólise (KORNALIK, 1985; WOLBERG, 2007).

Para restabelecer o fluxo sanguíneo, ocorre fibrinólise (dissolução do coágulo). Este evento é estimulado pelo sistema fibrinolítico e controlado por uma serinoprotease denominada plasmina, produzida pela ativação do plasminogênio (SWENSON, 2005).

4.2- Influência da peçonha ofídicas sobre a hemostasia

Segundo Markland (1998), define-se hemostasia como processos fisiológicos que, em conjunto, agem para manter o sangue fluido nos vasos normais. Em caso de lesão vascular, os processos hemostáticos são ativados rapidamente para promover a formação do tampão hemostático, evitando a hemorragia. Para que isso ocorra, logo após a lesão do tecido, três atividades são realizadas para promover o estancamento sanguíneo, são elas: espasmo do endotélio vascular, formação do tampão plaquetário e coagulação sanguínea.

O sistema hemostático humano é alvo de peçonha de serpentes viperídeas. Essas toxinas agem alterando a hemostasia. Muitas das enzimas da peçonha são fosfolipases A₂, nucleotidases, fosfodiesterases, L-amino oxidases, metaloproteases e

serinoproteases, enquanto outras, como desintegrinas e lectinas tipo-C, não possuem atividade enzimática (MARKLAND, 1998). Existem ainda as metaloproteases pró-coagulantes que são ativas sobre um substrato protéico, desprovidas de atividade hemorrágica e com atividade coagulante residual, como por exemplo a MPB. Esta enzima isolada por Moura da Silva e colaboradores (2003), possui atividade caseinolítica, não causa hemorragia e possui atividade coagulante discreta.

Os principais componentes ativos que interferem na hemostasia são agrupados em:

- a) Procoagulantes: ativadores de fatores V, X, IX e protrombina, assim como proteases similares a trombina (“thrombin-like”).
- b) Anticoagulantes: fosfolipases A₂ e a proteína C, que induz a formação dos complexo fator IX/X, inibindo a trombina.
- c) Fibrino(geno)líticas: proteases que agem sobre fibrinogênio, fibrina e toxinas ativadoras de plasminogênio.
- d) Hemorraginas: enzimas que degradam proteínas da membrana basal do endotélio.
- e) Ação sobre plaquetas: proteínas que induzem ou inibem a agregação plaquetária.

A interferência de toxinas presentes em peçonhas de serpentes na hemostasia ocorre, muitas vezes, devido a características únicas de atividade enzimática, estrutura e ligação. Em suma, as toxinas de peçonhas de serpentes são ferramentas importantes para estudos básicos de hemostasia, principalmente relativos à função plaquetária.

Referências

Amaral, A. 1925. South American snakes in the collection of the United States National Museum. Proc US Nat Mus. 67, 1-30.

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

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

Bjarnason, J.B.; Fox, J.W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake-venoms. Pharmacology & Therapeutics. 62, 325-372.

Bochner, R., Struchiner, C.J., 2003. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. Cadernos de Saúde Pública 19, 7-16.

Bode, W.; Gomis-Rüth, F.X.; Stöckler, W., 1993. 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 Letters. 31, 134-140.

Bohm, B.B., Aigner, T., Roy, B., Brodie, T.A., Blobel, C.P., Burkhardt, H., 2005. Homeostatic effects of the metalloproteinases disintegrin ADAM 15 in degenerative cartilage remodeling. Arthritis Rheum. 52, 1100-110.

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

Calvete, J.J., Juárez, P. & Sanz, L, 2007. Snake venomomics. Strategy and applications. J Mass Spectrom 42, 1405– 1414.

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

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

Chippaux, J.P., Goyffon, M., 1998. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon, 36, 823-846.

Costa, J.O., Petri, C.B., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M.I., Oliveira, C.Z., Soares, A.M., Oliveira, F., 2007. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* snake venom. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 13, 640-654.

Daltry, J. C., Wüster, W. & Thorpe, R. S., 1996. Diete and snake venom evolution. Natures, 379, 537-540.

Davie, E. W., Ratnoff, O. D., 1964. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science (Washington, D C), Washington. 145, n. 3637, 1310.

Davie, E. W., 2003. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. J. Biol. Chem. 278, n. 51, 50819-50832.

Estrade, G., Garnier, D., Bernasconi, F., Donatien, Y., 1989. 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.

Ettinger, S.J., Feldman, E.C., 1997. Tratado de Medicina Interna Veterinária. Manole: São Paulo, 4.ed. 459-460.

Fenwick, A.M.; Gutberlet Jr., R.L.; Evans, J.A.; Parkinson, C.L., 2009. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers,

genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). Zoological Journal of the Linnean Society. 156, 617-640.

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

Fox, J.W., Ma, L., Nelson, K., Sherman, N. E., Serrano, S.M., 2006. 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.

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

Frey Vogel, A. & Perret, B. A., 1973. Notes on toxicology. Experientia, 29 (11), 1137-1452.

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

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

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

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

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

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

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

Harker, L., 1997. The role of platelets in the early and the late vascular responses initiated by mechanical vascular injury. Fibrinol. Proteol. 11, 97-103.

Hoge, A.R., 1965. Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). Memórias do Instituto Butantan, 32: 109-184.

Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., HO, P. L. A., 2002. Survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). Gene, 299. 279-291.

Kornalik, F., 1985. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. Pharmacol. Ther. 29, 353–405.

Mac Farlane, R.G., 1964. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biological amplifier. Nature. 202: 498.

Markland, F.S., 1998. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An updated inventory. *Thromb.Haemost.*, 3, 668.

Marsh, N.; Williams, V., 2005. Practical Applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*, v.45 1171-1181.

Matsui, T., Fujimura, Y., Tatani, K., 2000. Review: Snake venom proteases affecting

hemostasis and thrombosis. *Bioch. Biophys. Acta*, 1477, 146-156.

Melgarejo, A.R., 2003. Serpentes peçonhentas do Brasil. Em: Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia clínica e terapêutica dos acidentes. Editora Sarvier, São Paulo.

Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos, 1999. Fundação Nacional de Saúde, Coordenação de Controle de Zoonoses e animais peçonhentos, Ministério da Saúde, Brasília.

Moura-da-Silva, A.M., Della-Casa, M.S., David, A.S., Assakura, M.T., Butera, D., Lebrun, I., et al, 2003. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Arch Biochem Biophys*. 409(2):395-401.

Oliveira, F., Rodrigues, M.V., Borges, M.H., Soares, A.M., Hamaguchi, A., Giglio, J.R., Homs-Brandeburgo, M.I., 1999. Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom *Bothrops moojeni* (Caissaca). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47, 1069–1077.

Oliveira, R. B., Ribeiro, L. A., Jorge, M. T., 2003. Risk factors associated with coagulation abnormalities in *Bothrops* envenoming. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36, 657-663.

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

Pinho, F.M.O., Pereira, I.D., 2001. Ofidismo. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, 47, 24-29.

Pough, F.H., Heiser, J.B., Mcfarland, W.N., 1999. A vida dos vertebrados. 2ª ed., São Paulo, Atheneu, 798.

Ra, H.J.; Parks, W.C., 2007. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biology*. 26, 587-596.

Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araújo, H.S., 2006. Review: Snake venom metalloproteases

structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Compar. Biochem. Phys.*, Part C, 142, 328-346.

Ribeiro, L.A., Jorge, M.T., 1988. Acidente por serpente venenosa: dados epidemiológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 21 (supl): 121-122.

Ribeiro, L.A., Jorge, M.T., Iversson, L.B., 1988. Epidemiologia do acidente por serpentes peçonhentas: Estudos de casos atendidos em 1988. *Rev de Saúde Pública*, 29 (5).

Salazar, A. M., Rodriguez A Costa, A., Girón, M. E., Aguilar, I., Guerrero, B. A., 2006. Comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. *Thrombosis Research*, (2)14, 95-104.

Silveira, P.F., Schiripa, L.N., Carmona, E., Picarelli, Z.P., 1992. Circulating vasotocin in the snake of *Bothrops jararaca*. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.*, 103:59-64.

SINAN - Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Estatística 2006. Ministério da Saúde. Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb> [Acessado em 03 de fevereiro de 2011].

Sousa, J. R. F., Monteiro, H. C., Castro, H. C., Zingali, R. B., 2000. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. *Toxicon*. 39, 787-792.

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

Tajahashi, T., Osaka, A., 1970. Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; complete separation of the principles from proteolytic activity. *Biochim Biophys Acta* 207, 65-75.

Tokarnia, C.H.; Peixoto, P.V., 2006. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 55-68.

Warshawsky, H., Haddad, A., Gonçalves, R., Veleri, V., De Lucca, F., 1973. Fine structure of the venom gland epithelium of the South American rattlesnake and radioautographic studies of protein formation by secretory cells. *Am J. Anat.* 138, 79-120.

Wolberg, A. S., 2007. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Reviews.* 21, 131-142.

Capítulo II

Purification and characterization of a fibrinogenolytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom

Purification and characterization of a fibrinogenolytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom

Nadia C. G. de Moraes^{a,c}, Carla C. Neves Mamede^{a,c}, Kelly C. Fonseca^{a,c}, Mayara R. de Queiroz^c, Saulo A. Gomes-Filho^a, Norival A. Santos-Filho^d, Karla de C. F. Bordon^d, Marcelo E. Beletti^b, Suely V. Sampaio^d, Eliane C. Arantes^d, Fábio de Oliveira^{b,c,*}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil

^b Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), Belo Horizonte-MG, Brazil

^d Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil.

*Corresponding author: Tel. (fax): +55-34-3218-2200. E-mail address: foliveira@umuarama.ufu.br

Abstract

A fibrinogenolytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom, named Moojenin, was purified by a combination of ion-exchange chromatography on DEAE-Sephacel and gel filtration on Sephacryl S-300. SDS-PAGE analysis indicated that Moojenin consists of a single polypeptide chain and had a molecular mass of about 45 kDa, under reducing conditions and 30 kDa, under non-reducing conditions. The N-terminal sequence of Moojenin was determined to be LGPDIVSPPVCGNELLEV and it showed identity with many other snake venom metalloproteinases. The enzyme cleaves the A α -chain of fibrinogen first, followed by the B β -chain, and shows no effects on the γ -chain. Moojenin showed coagulant activity on bovine plasma about 3.1 fold lower than crude venom. The fibrinogenolytic activity of Moojenin was abolished by preincubation with EDTA, 1,10-phenanthroline and β -mercaptoethanol, which also inhibited the coagulant activity. The coagulant activity was also inhibited by benzamidine and leupeptin. Moojenin showed maximum activity from 30 to 40 °C and the optimal pH was 4. Its activity was completely lost at temperatures above 50 °C. Moojenin caused relevant morphological alterations in liver and muscle, but it did not cause histological alterations in the lung, kidney and heart of mice. Moojenin rendered the blood uncoagulable when it was intraperitoneally administered to mice. Moojenin may be of medical interest because its anticoagulant activity can be explored for the prevention and treatment of a wide range of thrombotic disorders.

Keyword: Snake venom; *Bothrops moojeni*; metalloproteinase.

Resumo

Uma metaloprotease fibrinogenolítica da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* denominada Moojenina, foi purificada por uma combinação de cromatografias, sendo uma de troca iônica em DEAE-Sephacel e outra de gel filtração em Sephacryl S-300. A análise em SDS-PAGE indicou que Moojenina consiste em uma única cadeia polipeptídica e possui massa molecular de aproximadamente 45 kDa, sob condições redutoras e 30 kDa, sob condições não-redutoras. A sequência N-terminal de Moojenina foi determinada por LGPDIVSPPVCGNELLEV e mostrou homologia com muitas outras metaloproteases de peçonha de serpentes. A enzima cliva primeiro a cadeia A α do fibrinogênio bovino, seguido pela cadeia B β , e não mostra efeitos sobre a cadeia γ . A Moojenina apresentou atividade coagulante sobre plasma bovino cerca de 3,1 vezes menor que a peçonha bruta. A atividade de fibrinogenolítica da Moojenina foi inibida pela pré-incubação com EDTA, 1,10-fenantrolina e β -mercaptoetanol, que também inibe a atividade coagulante. A atividade coagulante também foi inibida por benzamidina e leupeptina. A Moojenina mostrou atividade máxima entre 30-40°C e o pH ótimo foi de 4. Sua atividade foi completamente perdida em temperaturas superiores a 50°C. A Moojenina causou relevantes alterações morfológicas no fígado e no músculo, mas não causou alterações histológicas no rim, pulmão e coração de ratos. Essa metaloprotease causou incoagulabilidade sanguínea quando foi administrada em camundongos por via intraperitoneal. A Moojenina pode ser de grande interesse médico, pois a sua atividade anticoagulante pode ser explorado para a prevenção e tratamento de uma ampla gama de distúrbios trombóticos.

1. Introduction

Snake venoms are a combination of many different proteins and enzymes, which have a diverse array of actions both on prey and human victims. Many of these proteins play many important roles such as to kill or immobilize the prey as well as assist in the digestion process (Kochva et al., 1983; Mackessy, 1988; Braud et al., 2000; Mackessy et al., 2003; Lu et al., 2005). Envenoming induced by the genus *Bothrops* is characterized by a complex pathophysiology which has been classified as local or systemic manifestations. Local effects are characterized by hemorrhage, necrosis, edema and intense pain. Systemic manifestations include coagulopathy, internal hemorrhage, cardiovascular shock and acute renal failure (Ribeiro and Jorge 1997; França; Málaque, 2003). The severity of the snakebite accidents depends on several factors such as age and size of the victim, number of bites, amount of venom injected, species and size of snake involved, sensitivity of the victim, pathogens present in the mouth of the serpent and the treatment (Russel, 1973). *B. moojeni*, popularly known as caíçaca or jararacão, is a large pitviper predominantly found in Central and Southeastern Brazil. This species is responsible for the most snakebite accidents registered in the Hospital of Clinics of Federal University of Uberlândia-MG (Da Silva et al., 2003). *B. moojeni* venom is rich in proteolytic enzymes, which are associated with specific biological activities, such as hemorrhagic, coagulant and anticoagulant activities and they are characterized by mainly affecting the hemostatic mechanism (Stocker and Barlow, 1976; Serrano et al., 1993a; Serrano et al., 1993b; Oliveira et al., 1999; Bernardes et al., 2008; Gomes et al., 2009). In the present work, we describe the purification procedure and partial characterization of a fibrinogenolytic metalloproteinase which probably was originated from the autolysis

processes of a PIIb class of snake venom metalloproteinases (SVMPs) from *B. moojeni* venom.

2. Material and methods

2.1. Material

Desiccated *B. moojeni* venom was purchased from Bioagents Serpentarium (Batatais-SP, Brazil). Acrylamide, ammonium persulfate, aprotinin, benzamidine, bromophenol blue, ethylenediaminetetracetic acid (EDTA), bovine fibrinogen, β -mercaptoethanol, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide, leupeptin, phenanthroline, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), sodium dodecyl sulfate (SDS) and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Glycine, Tris, molecular weight markers for electrophoresis and all chromatographic media were from Amersham Pharmacia Biotech. All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Animals

The male Swiss mice (20 g $\pm$ 5 g) were obtained from the Federal University of Uberlândia (Uberlândia-MG, Brazil). The animals were housed in a temperature-controlled room (23°C) on an automatic 12 h light/dark cycle (6 a.m. to 6 p.m. of light phase). Food and water were freely available until the beginning of the experiments. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Uberlândia (CEUA/UFU, Protocol number 028/09).

2.3. Isolation of Moojenin

Purification was carried out in two stages. *Bothrops moojeni* crude venom (400 mg) was dispersed in 2.0 mL of 0.05 mol/L ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8), clarified by centrifugation at $10,000\times g$ for 10 min and applied on DEAE–Sephacel column (1.5×15 cm). The chromatography was carried out at a flow rate of 40 mL/h, with a convex concentration gradient of the same buffer (0.05– 0.6 mol/L). The seventh fraction, named D7, was pooled, lyophilized, dissolved in 2.0 mL of 0.05 mol/L ammonium bicarbonate (pH 7.8) and submitted to second stage separation by using a HiPrep Sephacryl S-300 column (2.6 x 60 cm). Samples were eluted from this column with the same buffer at a flow rate of 1 mL/min. All peaks were monitored by absorbance at 280 nm. Isolated enzyme was named Moojenin.

2.4. Protein analyses

Protein concentration was determined by the method of Itzhaki and Gill (1964), using bovine serum albumin as standard. Electrophoresis using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (SDS–PAGE) was performed as described by Laemmli (1970) using 14% gels and stained with Coomassie blue R-250. The relative molecular mass of the Moojenin was estimated by Kodak 1D image analysis software.

2.5. N-terminal sequencing

The N-terminal sequence of Moojenin was determined by Edman degradation (Edman and Begg, 1967), performed on an automated sequenator model PPSQ-33A (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). The identity of the primary sequence of Moojenin compared with other proteins was searched by using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The amino acid sequences of four members of the PIIIb class of SVMs were retrieved

from the National Center for Biotechnological Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) and aligned using MultAlin Interface Page (Corpet, 1988).

2.6. Fibrinogenolytic activity

Fibrinogenolytic activity was assayed as described by Edgar and Prentice (1973), partially modified. Fibrinogen (1 mg/mL) and Moojenin (10 µg) were mixed 1:100 (w/w) and the mixture was incubated in (pH 4.0, 7.0 and 10.0) buffer saline at 37 °C for different time intervals (15, 30, 45, 60, 90 and 120 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 SDS–PAGE.

2.7. Heat stability

Moojenin and fibrinogen dissolved in phosphate, pH 4.0, were incubated for 15 min at 30–80 °C and the remaining fibrinogenolytic activity was determined as described above.

2.8. Determination of coagulant activity

The coagulant activity of the Moojenin was assayed on bovine plasma. The samples were collected into 3.8% sodium citrate (9:1, v/v) and centrifuged at $2.500\times g$ for 15 min at 4 °C to obtain platelet-rich plasma. Coagulant activity was determined by mixing 10 µg of Moojenin with 200 µL of citrated bovine plasma at 37 °C. Clotting formation was monitored by a coagulometer (CLO Timer) in intervals of 5 s for 5 min.

2.9. Enzyme inhibitors

Inhibition of fibrinogenolytic and coagulant activities was determined by incubating Moojenin (10 µg) dissolved in 200 µL of phosphate, pH 4, for 15 min at room temperature (25 °C) with one of the following inhibitors: 5 mmol/L benzamidine, 5 mmol/L β-mercaptoethanol, 5 mmol/L leupeptin, 5 mmol/L 1,10 phenanthroline and 5 mmol/L EDTA. Fibrinogenolytic and procoagulant activities were determined as previously described in Section 2.6 and 2.8, respectively.

2.10. Defibrinating activity

Defibrinating activity was tested using the method of Gene et al. (1989), with slight modifications. Briefly, four Swiss mice (18–20 g) were intraperitoneally (i.p.) injected with 50 µg of Moojenin dissolved in 200 µL saline; control animals received only 200 µL saline. After 1 h, animals were sacrificed by an overdose of ketamine/xylazine and bled by cardiac puncture. Whole blood was placed in tubes and kept at 25–30 °C until clotting occurred.

2.11. Histological analysis

In order to evaluate the systemic effects, the experimental animals (n=4) were i.p. injected with 50 µg of Moojenin, dissolved in sterile saline (50 µL). The myotoxic activity was evaluated by intramuscular injection of the Moojenin (50 µg/50 µL sterile saline) in the gastrocnemius muscle of the mice. Control group received 50 µL of sterile saline under identical conditions. After 24 hours, mice were killed by an overdose of ketamine/xylazine and the heart, lung, liver, kidney and gastrocnemius muscle were dissected out. For histological analysis, tissues were placed in 10% formaldehyde and processed routinely for embedding in paraffin. Thick sections (5 µm) were prepared and stained with hematoxylin-eosin (HE) for light microscopic observation.

3. Results and Discussion

Since the 60's, Nahas and colleagues showed that *Bothrops* venoms coagulate the plasma either via a direct action on fibrinogen or via the activation of factors II and X (Nahas et al., 1964). In this work, we describe the purification procedure and partial characterization of a fibrinogenolytic metalloproteinase with coagulant activity from *B. moojeni* venom. Fractionation of crude *B. moojeni* venom (400 mg) by ion-exchange chromatography on a DEAE-Sephacel column produced eight major protein peaks named D1 to D8 (Fig. 1A). The main coagulant activity was detected in D3 and D7 fractions (data not shown). D7 fraction was further fractionated in Sephacryl S-300 column (Fig. 1B). This chromatographic procedure allowed us to isolate a fibrinogenolytic enzyme which was named Moojenin. The enzyme showed a great purity level, as observed in electrophoresis gel. SDS-PAGE analysis indicated that the Moojenin consists of a single polypeptide chain and had a molecular mass of about 45 kDa, under reducing conditions and 30 kDa, under non-reducing conditions (Fig. 1C). In the presence of the reductor agent, the enzyme presents itself in a unfold state, in which his migration trough the gel is restricted. To improve the purity degree, the Moojenin was applied on a C2/C18 reverse-phase HPLC column, which disclosed a single peak (data not shown) and this pure peak was submitted to an automated N-terminal sequenator.

The 18 amino acid residues of the N-terminal of Moojenin resulted in the amino acid sequence LGPDIVSPPVCGNELLEV, as seen in Fig. 2. This primary sequence was submitted to BLAST and Moojenin shared high degree of identity with proteins of the PIIIb class of SVMPs.

Metalloproteinases PIIIb subclass can undergo proteolysis/autolysis generating the disintegrin-like and cysteine-rich domains (DC domain) (Fox and Serrano, 2005).

Both the nascent SVMPs and the processed DC domains have been isolated from viperid venoms (Fox and Serrano, 2005; Fox and Serrano, 2008). The unprocessed and mature forms of PIIIs have been found in venoms (Shimokawa et al., 1997; Moura-da-Silva et al., 2003; Fox and Serrano, 2008). However, no protease domain from a PIIIb has been isolated from snake venom (for review, see Fox and Serrano, 2008).

The spacer region, or linker, with the sequence EPLGTDIISP separates the M domain from the DC domains and includes a proteolytic site (Assakura et al., 2003; Moura-da-Silva et al., 2003; Muniz et al., 2008), but the cleavage site is not yet known. It has been observed that a degree of proteolytic processing occurs at the spacer domain in some members in each of the P classes, whereas in some PIII SVMPs, the spacer region is not processed (Fox and Serrano, 2008). For example, the processed PIIIb catrocollastatin-C has a spacer domain linked to the disintegrin-like domain (Fox and Serrano, 2008) and Moojenin sequence shows significant sequence conservation with this region, as observed in Fig. 2. In the other hand, native jararhagin-C (Usami et al., 1994) and ALT-C (Souza et al., 2000) contain only the DC domains with the amino acid sequence IISPPVCGNELLEV, which indicates that the D domain begins at Ile210 (Muniz et al., 2008). This leads the authors to speculate that Moojenin is a processed metalloproteinase belonging to PIIIb subclass and it contains the spacer domain and, presumably, the DC domains.

One striking observation is the presence of a proline (Pro208, numbering according to Bothropasin, PDB: 3DSL) at the spacer domain in Moojenin, while a threonine (Thr208) is observed in the other sequences used in the alignment (Bothropasin, Jararhagin, Catrocollastatin and Acurhagin). Additional studies are necessary to speculate how the substitution by a rigid and cyclic apolar amino acid can interfere in the structure or function of Moojenin.

The proteolytic activity of the Moojenin was assayed on bovine fibrinogen. Moojenin degraded fibrinogen, as evidenced by the appearance of new protein bands at the bottom of the gel. Apparently, Moojenin completely degraded the A α -chain and B β -chain of fibrinogen, in a time-dependent manner (Fig. 3A). The A α -chain was totally degraded with the lowest time (15 min), while B β -chain was degraded with the highest time (90 min). The γ -chain appeared unaffected throughout the incubation period examined. The optimal temperature range for the degradation of chains of fibrinogen was determined to be 30 - 40 °C. Activity was completely lost at $\geq 50^{\circ}\text{C}$ (Fig. 3C). The digestion pattern of Moojenin is similar to other purified metalloproteinases from bothropic venom, for example, BleucMP from *B. leucurus* (Gomes et al., 2011), BlaH1 from *B. lanceolatus* (Fer-de-lance) (Stroka et al., 2005) and BmooMP α -I from *B. moojeni* (Bernardes et al., 2008). All these enzymes are classified as α -fibrinogenases. They degrade the A α -chain of fibrinogen first, followed by the B β -chain, and show no effect on the γ -chain.

SVMPs are usually more active in pHs ranging from neutral to basic (Manning, 1995; Xu et al., 2004). Interestingly, for the first time, we demonstrated the action of a protease at acidic pH. Moojenin degrades chains of fibrinogen at pH 4, but not in pHs ranging from neutral to basic (Fig. 3B). Chelating agents such (5 mmol/L) EDTA and (5 mmol/L) 1,10 phenanthroline and β -mercaptoethanol partially inhibited the fibrinogenolytic activity of the enzyme. In contrast, benzamidine, leupeptin and PMSF did not affect either activity (fig. 3D).

In recent decades, numerous snake venom serine and metalloproteinases have been isolated and characterized (Serrano and Maroun, 2005). These proteases affect, for example, fibrinogenolysis, platelet aggregation, complement system, blood pressure

and blood coagulation (Zhang et al., 1998; Markland, 1998; Castro et al., 2004; Kini, 2005; Serrano and Maroun, 2005).

Interestingly, Moojenin presented coagulant activity. These results are according with the finding by Moura da Silva and colls (1991). These authors also purified a metalloproteinase, denominated MPB, with a residual coagulant activity. Coagulant activity on bovine plasma of crude venom was about 3.1 fold higher than Moojenin (Table 1). Table 2 shows the effects of several inhibitors on the coagulant activity of Moojenin. Incubation of the isolated enzyme for 15 min at 37 °C with leupeptin and 1,10 phenanthroline (5 mM) completely abolished its fibrinogenolytic activity. The activity of the enzyme was partially abolished by EDTA (50%), β -mercaptoethanol (66%) and benzamidine (45%).

Our results showed that Moojenin (50 μ g) rendered the blood uncoagulable when administered to mice. Moojenin acts in vivo apparently by depleting the circulating fibrinogen. These data suggest the potential use of this enzyme as an anticoagulant for the prevention and treatment of a wide range of thrombotic disorders.

Myotoxicity is very common in *Bothrops* envenoming, generally associated with other local effects as hemorrhage, edema and pain (Nishioka and Silvera, 1992). Several myotoxic components were isolated from *Bothrops* snake venom, such as proteinases BaH1 (Gutiérrez et al., 1995), Bhalternin (Costa, et al., 2010) and BleucMP (Gomes et al., 2011). Histological examination showed relevant morphological alterations in the skeletal muscle and hepatic tissues induced by Moojenin. The myonecrosis induced by Moojenin was mainly characterized by extensive altered cell morphology and inflammatory reaction. Figure 4B shows light micrographs of sections of mouse gastrocnemius muscle. Moojenin caused intense myonecrosis evidenced by

disorganized myofibrils, abundant inflammatory infiltrate (mainly polymorphonuclear cell infiltration) and fatty degeneration.

The systemic effects of the bothropic snakebites are frequently associated with hemorrhagic, coagulant and proteolytic activities that result in inflammatory process and tissue destruction, triggering systemic failure (Warrell, 1995; Teibler et al., 1999). In order to evaluate the systemic effects, the mice were i.p. injected with Moojenin (50 µg) and the heart, lung, liver and kidney were dissected out and analyzed histologically. Figure 4E shows light micrographs of hepatic tissue evidencing necrosis and inflammatory infiltrate in central regions of the tissue induced by Moojenin. Control groups did not shown changes. In the lung, kidney and heart, Moojenin did not induce histological alterations.

In this work, we also investigated the involvement of Moojenin in hyperalgesic and oedematogenic responses. The intraplantar injection of Moojenin (50 µg) into the rat hind-paw did not cause oedematogenic and hyperalgesic effects statistically significant, compared to initial values (data not shown). These results indicate that Moojenin does not participate of the genesis of these phenomena.

The high sequence identity suggest that Moojenin is a peptide constituted by disintegrin-like domains and cysteine-rich, originated from the autolysis processes of a metalloprotease of the PIII class.

In this work, we describe the purification procedure and partial characterization of a fibrinogenolytic enzyme with molecular weight about 45kDa. The high sequence identity suggest that Moojenin is a peptide constituted by disintegrin-like domains and cysteine-rich, originated from the autolysis processes of a metalloprotease of the PIII class. This enzyme presents optimal activity at pH 4 and 30-40°C. It is inhibited by

EDTA, β -mercaptoethanol, 1,10 phenantroline and smaller proportion by benzamidine. The Moojenin has a pro-coagulant activity but don't cause bleeding. Further studies are needed to improve your knowledge about these important activities of the SVMPs that must be used in medicine, pharmacology and biotechnology.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of State of Minas Gerais Research Foundation (FAPEMIG), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Ministry of Science and Technology (MCT) of Brazil.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

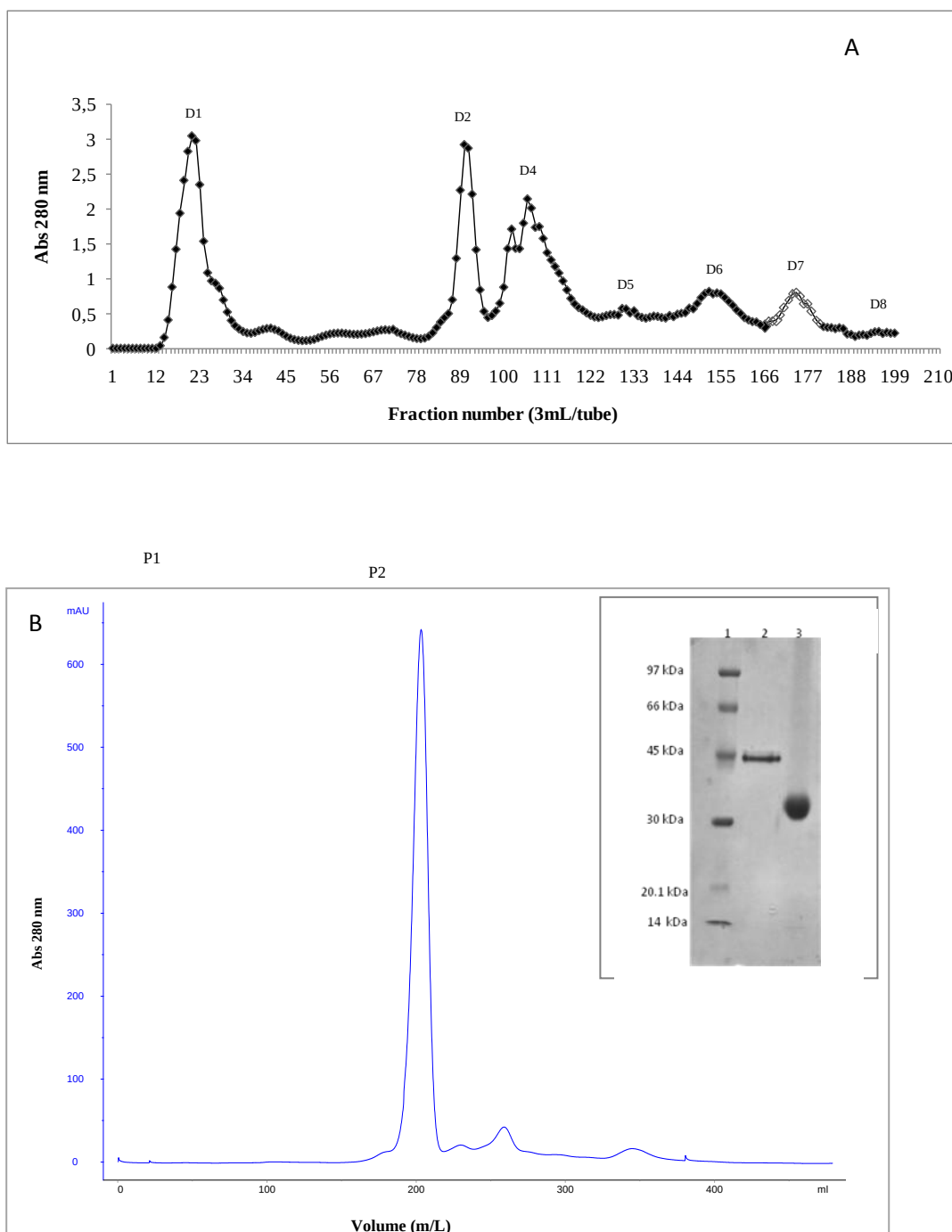


Figure 1. Purification of Moojenin. (A) Anion-exchange chromatography of crude *Bothrops moojeni* venom on a DEAE–Sephacel column (1.5 × 15 cm) equilibrated with 0.05 mol/L ammonium bicarbonate (pH 7.8) and eluted with a convex concentration gradient of the same buffer (0.05 – 0.6 mol/L). (B) Gel filtration of the seventh fraction (indicated by the empty lozenge) on a Sephacryl S-300 column (2.6 x 60 cm) equilibrated and eluted with 0.05 mol/L ammonium bicarbonate (pH 7.8). (C) SDS–PAGE: Lane 1 - standard proteins. Lane 2 – Moojenin (10 µg) under reducing conditions. Lane 3 – Moojenin (10 µg) non-reducing.

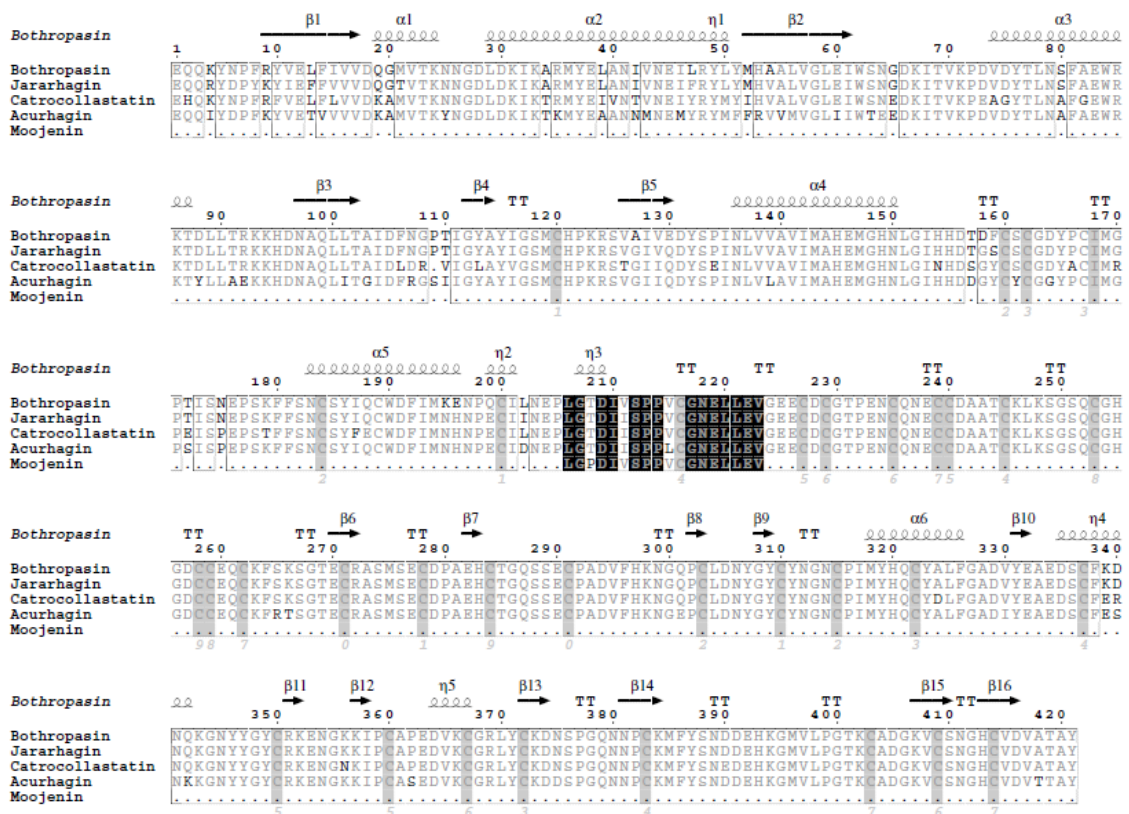


Figure 2. Sequence alignment of Moojenin (bottom) and members of the PIIIb class of SVMs (Bothropasin, Jararhagin, Catrocollastatin and Acurhagin). Numbering is according to Bothropasin (PDB: 3DSL). The conserved residues are boxed. Cys residues are shaded gray. The highly conserved residues are shown in boxes black. Alignment and figure were generated by MultAlin (CORPET, 1988) and ESPrift (GOUET et al., 1999) servers, respectively.

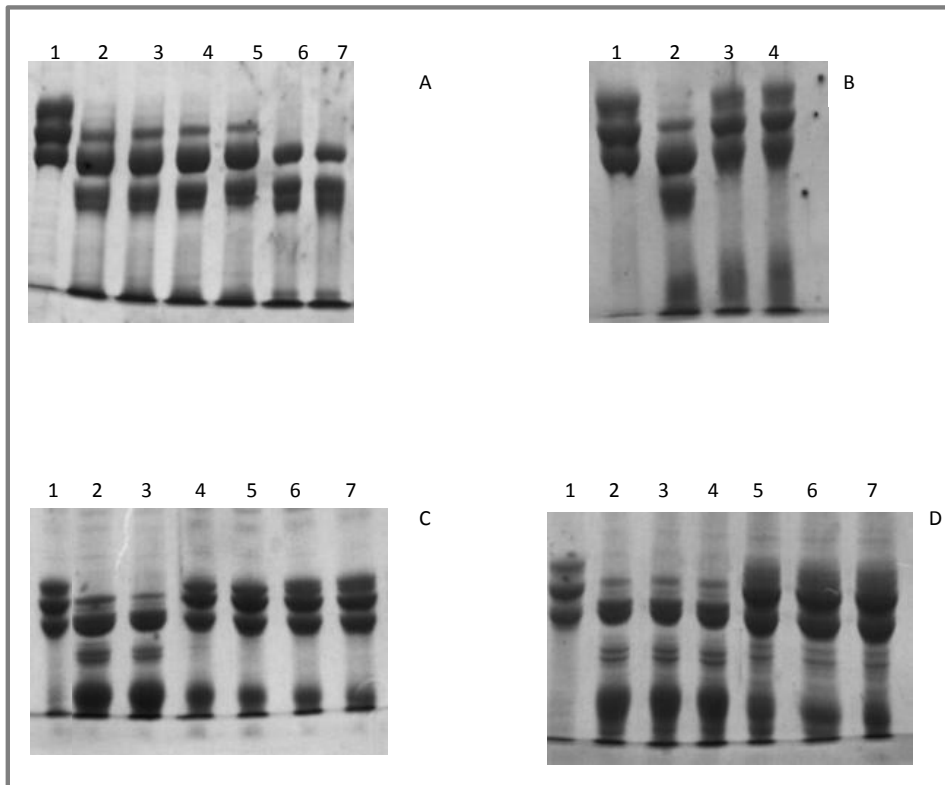


Figure 3. SDS-PAGE analysis of bovine fibrinogen after digestion by Moojenin. Lanes: 1- Control fibrinogen incubated without enzyme for 120 min. (A) 2-7 fibrinogen incubated with enzyme for 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min, respectively. (B) 2-4 fibrinogen incubated with enzyme in pH 4, 7 and 10, respectively. (C) 2-7 fibrinogen incubated with pre heated enzyme for 60 min at 30, 40, 50, 60, 70 and 80 °C, respectively. (D) 2-7 fibrinogen after incubation with enzyme and 5 mmol/L PMSF, 5 mmol/L leupeptin, 5 mmol/L benzamidine, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 1, 10-phenanthroline and 5 mmol/L β -mercaptoethanol, for 60 min, respectively.

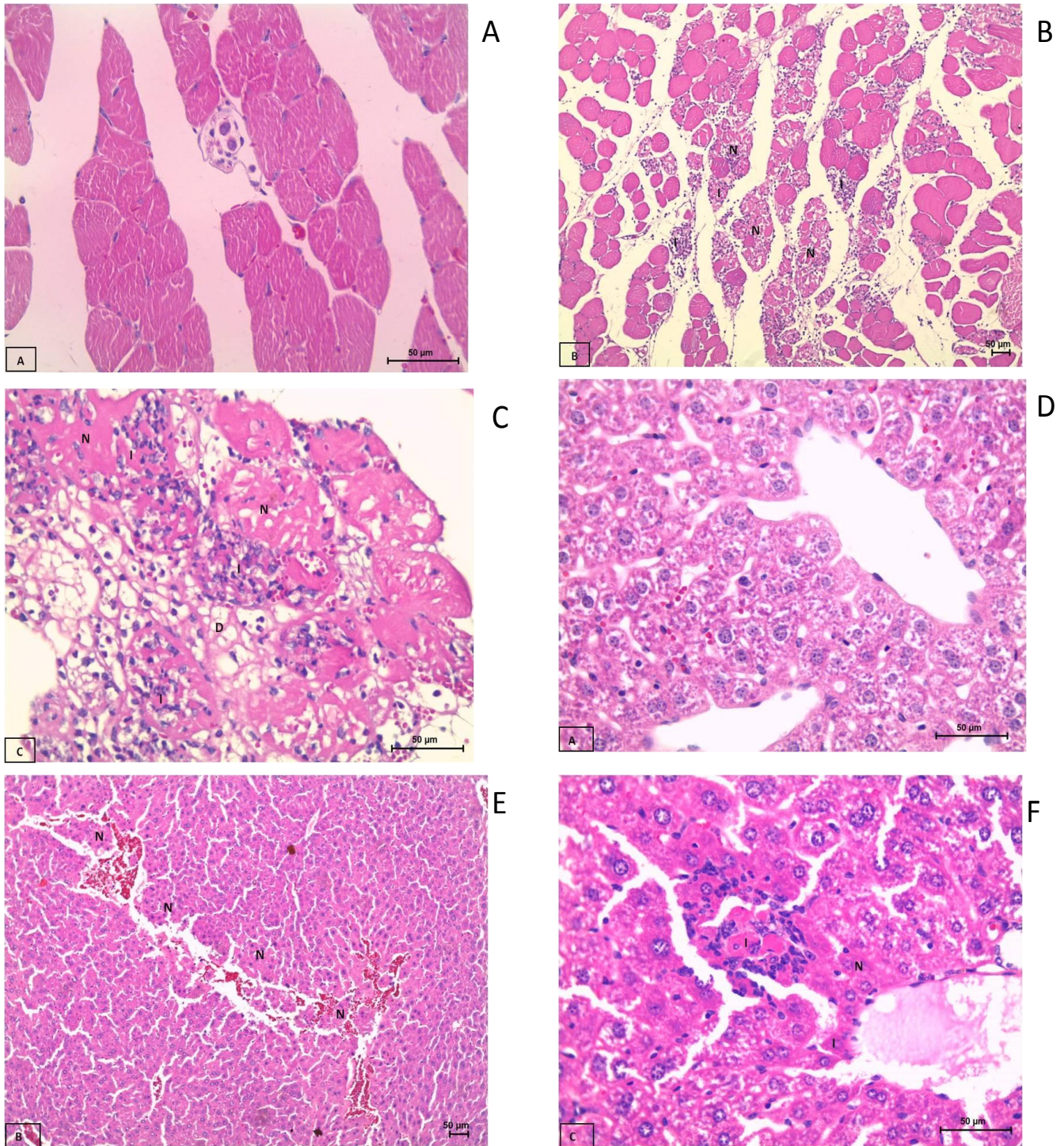


Figure 4. Light micrographs of sections of mouse gastrocnemius muscle (A-C) and hepatic tissue (D-F) 24 h after injection of 50 μg of Moojenin/50 μL saline, stained with hematoxylin-eosin. (A): Control mice injected with saline: normal skeletal fibers. (B) and (C): Moojenin: notice the presence of necrosis evidenced by inflammatory infiltrate, cell destruction and fatty degeneration. (D): Control: normal hepatic tissue. (E) and (F): Moojenin: necrosis evidenced by morphological alteration of the hepatic cells and inflammatory infiltrate. Letter indicates the presence of necrosis (N), inflammatory infiltrate (I) and fatty degeneration (D).

Table 1. Comparison of procoagulant activity of crude venom and Moojenin

Samples	Procoagulant activity (s)
Plasma	
Crude venom	14 ± 1.3
Moojenin	44 ± 1.6

Procoagulant activity was determined by mixing 50 µg of Moojenin with 200 µL of citrated bovine plasma at 37 °C. Clotting formation was monitored by a coagulometer in intervals of 5 s for 5 min . Data are expressed as mean ± SD (*n* = 3).

Table 2. Effect of some inhibitors on coagulant activity of Moojenin

Inhibitor	Residual activity (%)
Plasma	
No inhibitor	100
β-mercaptoethanol	66
EDTA	48
Benzamidine	45
Leupeptin	00
1,10 Phenanthroline	00

The Moojenin (50 µg) was treated with each protease inhibitors at the same concentration (5 mmol/L) in buffer, pH 4 at 37 °C for 30 min. The coagulant activity was determined as described under Materials and methods. Control was performed without inhibitor. These values are expressed as percentages relative to control and are given as mean ± S.D (*n* = 3).

References

- Assakura MT, Silva CA, Mentele R, Camargo AC, Serrano SM., 2003. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Toxicon*. 41(2):217-27.
- Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Costa T.R., Gomes, M.S.R., Torres, F.S., Costa, J, Borges, M.H., Richardson, M., Dos Santos, D.M., Pimenta AMC, Homsí-Brandeburgo MI, Soares AM, Oliveira F., 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, 51, 574–584.
- Castro, H. C.; Zingali, R.B.; Albuquerque, M.G.; Pjol-Luz, M.; Rodrigues, C.R., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *CMLS*. 61, 843-856
- Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, London, v. 16, n. 22, 10881-10890.
- Costa, F. L. S., Rodrigues, R. S., Izidoro, L. F. M., Menaldo, D. L., Hamaguchi, A., Homsí-Bradeburgo, M. I., Fuly, A. L., Soares, S. G., Selistre-de-Araújo, H. S., Barraviera, B., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., 2009. Biochemical and Functional Characterization of a Thrombinlike enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*, v. 54, p. 725-735, 2009.
- Costa, J. O.; Fonseca, K. C.; Mamede, C. C. N.; Beletti, M. E.; SantosFilho, N. A.; Soares, A. M.; Arantes, E. C.; Hirayama, S. N. S.; Selistre-de-Araújo, H. S.; Fonseca, F.; Henrique-Silva, F.; PenhaSilva, N.; Oliveira, F., 2010. Bhalternin: Functional and Structural Characterization of a new Thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon*, 55, 1365-1377.
- Da Silva, C.J.; Jorge, M.T.; Ribeiro, L.A., 2003. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon*, 41, 251–255.
- Edgar, W., Prentice, C.R.M., 1973. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. *Thrombosis Research* 2, 85.
- Edman, P., Begg, G., 1967. A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, 1, n. 1, 80-91.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. 45(8):969-85.

Fox, J.W., Serrano, S.M., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J.* 275(12):3016-30.

França, F. O. S., Málaque, C. M. S., 2003. Acidente botrópico. *In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* Cardoso et al. (Orgs.). Sarvier, São Paulo – SP. 72-86.

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

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

Gutiérrez, J.M., Romero, M., Di'az, C., Borkow, G., Ovadia, M., 1995. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 33, 19–29.

Itzhaki, R.F., Gill,D.M., 1964. A microbiuret method for stimating proteins. *Analytical Biochemistry* 9, 401- 410.

Kini, R.M., 2005a. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon* 45, 1133–1145.

Kochva, E., O. NAKAR, AND M. OVADIA. 1983. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. *Am. Zool.* 23:427–430.

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

Lu, Q., Clemetson, J.M., Clemetson, K.J., 2005. Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.3, p.1791-1799.

Mackessy, S . P., 1988. Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes *Crotales viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *Copeia* 1988, 92-101.

Mackessy, S.P., K. Williams, and K.G. Ashton. 2003. Ontogenetic Variation in Venom Composition and Diet of *Crotalus oreganus concolor*: A Case of Venom Paedomorphosis? *Copia*, 4:769-782.

- Manning, M.C., 1995. Sequence analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from *Agkistrodon contortrix contortrix*. *Toxicon*. 33(9), 1189-1200.
- Markland, F.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 36, 1749-1800.
- Marsh, N., Williams, V., 2005. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*. 45, 1171-1181.
- Moura-da-Silva, A.M., Della-Casa, M.S., David, A.S., Assakura, M.T., Butera, D., Lebrun, I., et al, 2003. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Arch Biochem Biophys*. 409(2):395-401.
- Muniz, J.R.C., Ambrosio, A.L.B., Selistre-de-Araujo, H.S., Cominetti, M.R., Moura-da-Silva, A.M., Oliva, G., et al, 2008. The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: Insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. *Toxicon*. 52(7):807-16.
- Nahas, L., Denson, K.W.E., Macfarlane, R.G., 1964. A study of the coagulant action of eight snake venoms. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 12, 355.
- Nishioka, S.A., Silvera, P.V.P., 1992. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 805–810.
- Oliveira, F., Rodrigues, M.V., Borges, M.H., Soares, A.M., Hamaguchi, A., Giglio, J.R., Homsí-Brandeburgo, M.I., 1999. Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom *Bothrops moojeni* (Caissaca). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47, 1069–1077.
- Ribeiro L.A. and Jorge M.T. 1997. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3139 casos. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 30(6): 475- 480.
- Russell, F.E., 1973. Venomous animal injuries. *Current Problems in Pediatrics*, v.3, p.3-47.
- Serrano, S. M. T.; Maroun, R. C., 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. 45, 1115-1132.
- Serrano, S.M.T., Matos, N.F.C., Mandelbaum, F.R., Sampaio, C.A.M., 1993a. 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, 471–481.

- Serrano, S.M.T., Sampaio, A.M., Mandelbaum, F.R., 1993b. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP and MSP 2. *Toxicon* 31, 483–492.
- Shimokawa, K.I., Shannon, J.D., Jia, L.G., Fox, J.W., 1997. Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cysteine-rich two domain protein from *Crotalus atrox* venom, *Arch. Biochem. Biophys.* 343, 35–43
- Souza, D.H., Iemma, M.R., Ferreira, L.L., Faria, J.P., Oliva, M.L., Zingali, R.B., 2000. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion. *Arch Biochem Biophys.* 384(2):341-50.
- Stocker, K. F.; Barlow, G. H., 1976. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). *Methods in Enzymology* 45, 214-223.
- Stroka, A., Donato, L., Bon, C., Hyslop, S., Lôbode Araújo, A., 2005. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. *Toxicon*, 45, 411-420.
- Teibler P., Pérez O.A., Maruñaque S., Ruiz R., Koscińczuk P., Sánchez Negrette M. & Mussart de Coppo N. 1999. Lesiones locales y sistemicas inducidas por veneno de *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina. *Acta. Toxicol. Argent.* 7(1):7-10.
- Warrell, D. A., 1995. Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabian Peninsula. In: Meier J, White J, eds. *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. Boca Raton, FL: CRC Press. 433–492.
- Xu, K.P., Ding, Y., Ling, J., Dong, Z., Yu, F.S., 2004. Wound-induced HB-EGF ectodomain shedding and EGFR activation in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 813-820.
- Zhang, Y., Gão, R., Lee, W.H., Zhu, S. W., Xiong, Y.L., Wang, W.Y., 1998. Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom, and comparative study with other venom proteases. *Toxicon*. 36, 131-142.