



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

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA NOVA
METALOPROTEINASE ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothropoides pauloensis*
(*Bothrops pauloensis*)**

Dayane Lorena Naves de Souza

Orientadora: Prof^a Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

UBERLÂNDIA - MG
2011



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

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA NOVA
METALOPROTEINASE ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothropoides pauloensis*
(*Bothrops pauloensis*)**

Dayane Lorena Naves de Souza

Orientadora: Prof^a Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

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

UBERLÂNDIA - MG
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S729c Souza, Dayane Lorena Naves de, 1987-
Caracterização bioquímica e funcional de uma nova metaloproteí-
nase isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (Bothrops pau-
loensis) [manuscrito] / Dayane Lorena Naves de Souza. – 2011.
94 f. : il.
- Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses. 2. Bothrops - Teses. I.
Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
III. Título.

CDU: 615.919:598.126



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

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA NOVA
METALOPROTEINASE ISOLADA DA PEÇONHA DE *Bothropoides pauloensis*
(*Bothrops pauloensis*)**

Dayane Lorena Naves de Souza

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: _____
Profa Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores: Dr Eládio Oswaldo F. Sánchez
Dr Rone Cardoso

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

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

Profª Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dedicatória

A MINHA MÃEZINHA, Nidalva, que amo muito. Pelo esforço e sacrifício por querer sempre o melhor a mim e a minha irmã, e por estar sempre ao meu lado com seu Amor Incondicional. Saiba que não tenho palavras para agradecer o quanto a senhora é importante em minha vida e saiba que, tudo que tenho é graças a senhora.



A meu Tio Ronaldo, por sempre estar ao meu lado incentivando e apoiando por ser mais que um tio, é um AMIGO, que sempre posso contar não importe o que aconteça.



A minha irmãzinha, Loyane, que amo muito, pela amizade e muita paciência. Apesar de ser mais nova, é quem me aconselha em momentos difíceis e me conhece como ninguém.



Vocês são o meu “PILAR DE AMOR E VIDA”.

Agradecimentos

♥ A **DEUS**, por sempre iluminar e proteger o meu caminho e nele colocar pessoas maravilhosas.



À profª Drª Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, pela orientação durante esses anos, e sobretudo pela amizade. Pessoa que admiro profissionalmente, mas acima de tudo, por ser uma pessoa carinhosa, honesta e humilde. É uma MÃE que sofre, chora e sorri com seus filhos. E nos incentiva a buscar nossos sonhos. Não tem como colocar em palavras Veri, o quanto sou grata a você e espero que nossa amizade continue ao longo de muitos anos.



À professora Maria Inês Homs Brandeburgo por ter me apresentado a Bioquímica, onde de certa forma tudo começou.



À profª Amélia Hamaguchi pelos conselhos e pelos ensinamentos que contribuem para minha formação.



Ao meu amigo Francis, sempre me auxiliar. Sei que não é fácil me agüentar e já tem uns aninhos que nos conhecemos. E espero que nossa amizade perdure por muitos anos.



Ao Mário, que conheço a tão pouco tempo, mas que só tenho a agradecer por sempre me ajudar.



À Letícia, “Chaverinho do Laboratório”, não lembro muito bem como começamos nossa amizade, mas que ela continue por muitos e muitos anos.





À Renata, pela oportunidade que Deus me deu de conhecê-la melhor, só tenho a agradecer por sempre estar ao meu lado e nossa amizade cresça com os anos.



À Débora e Isabela, amigas que conheci no laboratório que me auxiliam e se preocupam comigo.



Aos meus colegas do laboratório: Mirian, Sarah, Lamartine, Lino, David, Thais e Guilherme.



Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica: Tianinha, Marina, Géron, Madson, Ana Paula e Jusciane.



Ao apoio financeiro da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) e da UFU (Universidade Federal de Uberlândia).

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	01
CAPÍTULO 1.....	03
1. INTRODUÇÃO GERAL	04
1.1. Serpentes.....	04
1.2. Com posição da peçonha: aspectos estruturais e funcionais de seus principais componentes enzimáticos	06
1.3. Estrutura e função de Metaloproteinases	15
1.3.1. Metaloproteinases de peçonhas de serpentes (SVMPs – <i>Snake Venom Metalloproteases</i>).....	18
1.3.1.1. Domínios estruturais e classificação das SVMPs de serpentes.....	19
1.3.1.2. Hemostasia e SVMPs	24
2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO 2.....	37
RESUMO	39
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS	44
2.1. Peçonha e animais	44
2.2. Reagentes para eletroforese, cromatografia, seqüenciamento, ensaios enzimáticos e biológicos.....	45
2.3. Isolamento da metaloproteinase BpMP-I.....	45
2.3.1. Cromatografia CM-Sepharose <i>Fast Flow</i>	45
2.3.2. Cromatografia em gel de filtração Sephacryl S300	46
2.3.3. Cromatografia de alta eficiência em modo fase reversa (HPLC-RP)	46
2.4. Dosagem de proteínas	46
2.5. Caracterização Bioquímica.....	47

2.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes e determinação do peso molecular.....	47
2.5.2. Determinação da seqüência.....	48
2.6. Caracterização Enzimática.....	49
2.6.1. Atividade azocaseinolítica.....	49
2.6.2. Atividade fibrinogenolítica.....	50
2.6.3. Atividade Coagulante.....	50
2.6.4. Atividade Fibrinolítica.....	51
2.6.5. Atividade sobre substratos cromogênicos.....	51
2.6.6. Atividade Hemorrágica.....	52
2.7. Ensaio Imunoquímico.....	52
2.7.1. Produção e purificação de anticorpos policlonais anti-BpMP-I e anti-peçonha (anti-Bp).....	52
2.7.2. Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha <i>B. pauloensis</i> pelos anticorpos anti-BpMP-I e anti-peçonha.....	54
2.7.3. Neutralização dos distúrbios da coagulação.....	54
2.8. Análise Estatística.....	55
3. RESULTADOS.....	55
3.1. Isolamento e caracterização bioquímica da metaloproteína BpMP-I.....	55
3.2. Sequenciamento parcial da BpMP-I.....	59
3.3. Caracterização enzimática e biológica.....	61
3.4. Ensaio Imunoquímico.....	65
3.4.1. Produção e purificação de anticorpos anti-BpMP-I e anti-peçonha.....	65
3.4.2. Neutralização da atividade hemorrágica.....	65
3.4.3. Neutralização dos distúrbios da coagulação.....	66
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Aparato de inoculação da peçonha <i>Daboia siamensis</i>	4
Figura 2. Distribuição geográfica e padrão de manchas da espécie <i>Bothropoides pauloensis</i>	6
Figura 3. Análise venômica de peçonhas botrópicas	11
Figura 4. Estrutura das serinoproteases de peçonhas de serpentes.....	13
Figura 5. Representação esquemática da estrutura do sítio ativo das metaloproteases da família das metzincinas.	16
Figura 6. Modelo de zimogênio da adamalisina metaloprotease isolada da peçonha de serpente	17
Figura 7. Metaloproteinases da peçonha de serpentes.....	20
Figura 8. Diagrama esquemática da divisão das metaloproteinases de peçonha de serpentes.....	22
Figura 9. Diagrama esquemático da divisão das SVMs com modificações propostas por Fox e Serrano (2005).....	23
Figura 10. Classificação de metaloproteinases de peçonha de serpentes (2008).24	
Figura 11. Estrutura do fibrinogênio	25

Capítulo 2

Figura 1. Passos sequenciais para purificação da BpMP-I.....	57
Figura 2. Alinhamento entre a BpMP-I e outras metaloproteinases de peçonha de serpentes.....	60
Figura 3. Determinação da atividade proteolítica da BpMP-I sobre a azocaseína	62
Figura 4. Atividade fibrinogenolítica em PAGE-SDS 12,5% em diferentes condições experimentais	63
Figura 5. Determinação da atividade amidolítica da BpMP-I sobre diferentes substratos cromogênicos.....	64
Figura 6. Purificação e titulação da produção de anticorpos policlonais	67

Figura 7. Reatividade cruzada dos IgG anti BpMP-I pelo ELISA.....	68
Figura 8. Atividade Hemorrágica	68
Figura 9. Determinação da concentração de fibrinogênio plasmático e a neutralização	70

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Componentes das peçonhas de serpentes da Família Viperidae e características químicas e funcionais	07
--	----

Capítulo 2

Tabela I. Rendimento protéico e atividade enzimática da BpMP-I	59
Tabela II. Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de <i>Bothropoides pauloensis</i>	69
Tabela III. Neutralização dos distúrbios sanguíneos causados pela peçonha bruta de <i>Bothropoides pauloensis</i>	69

Apresentação

Os acidentes ofídicos têm importância médica em virtude de sua grande frequência e gravidade. No Brasil, os principais acidentes são causados por serpentes botrópicas e caracterizam-se por efeitos locais e sistêmicos. Os efeitos sistêmicos mais comuns são a indução do estado de choque (principal causa de morte), distúrbios na coagulação sangüínea, alterações cardiovasculares, hemorragias gastrointestinais, náuseas, vômitos e hematúria. Quanto aos efeitos locais destacam-se dor, edema, hemorragia local e necrose tecidual, que dependendo do local afetado, tempo decorrido entre o acidente, aplicação do soro e quantidade de peçonha injetada, podem levar a perda do tecido ou a amputação do membro.

As peçonhas botrópicas são um complexo de compostos biologicamente ativos incluindo aqueles com atividade enzimática (metaloproteíases, serinoproteíases, fosfolipases A₂, Aminoácido-oxidases, entre outros) ou isentas de ação enzimática (desintegrinas, lectinas tipo-C, entre outros) os quais por ação individual ou sinergicamente podem provocar resposta inflamatória, hemorragia e necrose tecidual, assim como alterações profundas no sistema hemostático.

No presente trabalho foi isolada uma metaloprotease do veneno de *Bothropoides pauloensis* e determinadas as principais propriedades estruturais, farmacológicas e imunoquímicas. Esses estudos nos permitem compreender melhor a natureza dessas moléculas e abrem caminho para novos trabalhos de pesquisa básica e aplicada

A apresentação deste trabalho foi realizada seguindo as normas do curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia-MG e da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT, sendo dividida em dois capítulos. O CAPÍTULO 1 – Introdução geral ou revisão bibliográfica elucidando características das serpentes, assim como os componentes presentes em suas peçonhas, enfatizando principalmente as metaloproteíases de serpentes (SVMPs). O CAPÍTULO 2 – apresenta o artigo intitulado: Caracterização bioquímica, funcional e imunoquímica de uma nova metaloproteíase (BpMPI) isolada de peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*) (artigo em preparação).

Capítulo 1:

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Serpentes

As serpentes peçonhentas estão amplamente distribuídas nos países situados entre as latitudes 50°N e 50°S no hemisfério ocidental e 65°N (Escandinava) e 50°S no hemisfério oriental e podem ser encontradas em até 4000 m de altitude acima do nível do mar, cordilheira do Himalaia e nas Américas(WARRELL,2010) .

Aproximadamente 2650 espécies de serpentes (Caenophidia) são capazes de injetar ou inocular a peçonha secretada pelas glândulas orais (glândula de Duvernoy – **Figura 1**) através de presas especializadas (WARRELL, 2010).

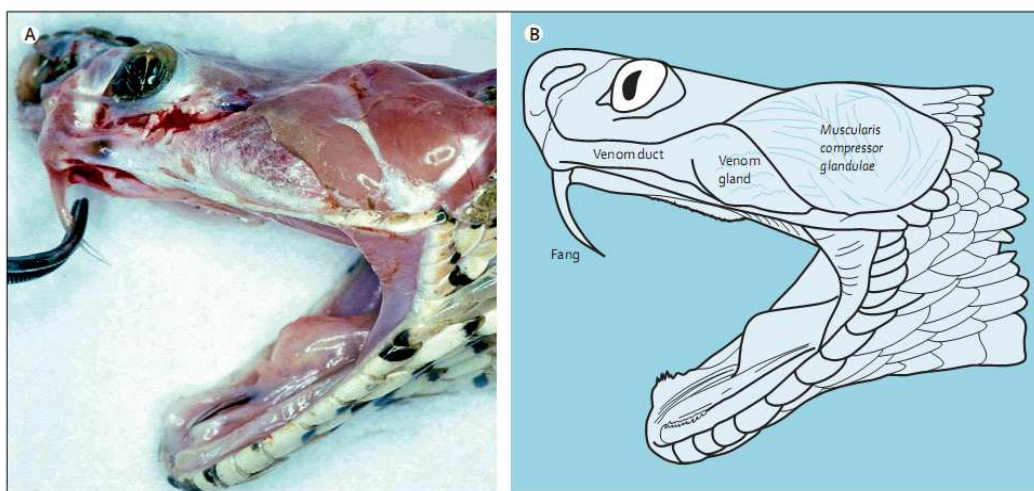


Figura 1: Aparato de inoculação da peçonha, *Daboia siamensis* A: Espécime dissecado B: Diagrama Fonte: WARRELL, 2010

Existem 4 famílias com grande relevância médica: Colubridae, Elapidae, Viperidae e Atractaspididae. A família Viperidae é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Brasil e seus principais representantes estão presentes na subfamília Crotalinae: *Caudisona* (*Crotalus*), *Lachesis*, *Bothropoides*, *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias* e *Rhinocerophis*.

As serpentes do gênero *Bothrops* vivem, geralmente, em locais úmidos, podem ser encontradas em zonas rurais e periferias de grandes cidades. Possuem hábitos noturnos e a maioria é terrícola. São conhecidas comumente

por: jararaca, jaracuçu, urutu, cotiara, boca-de-sapo entre outros (VALLE; BRITTES, 2008).

A maioria das espécies do gênero apresenta uma alimentação generalista, porém ocorrem variações ontogenéticas, onde os animais juvenis têm preferência por presas ectotérmicas (centípedes, lagartos e anfíbios) e os adultos, por presas endotérmicas (roedores e aves). As espécies *B. alternatus*, *B. fonsecai* e *B. neuwiedi* alimentam exclusivamente de roedores.

A espécie *Bothrops neuwiedi* foi primeiramente descrita em 1824 por Wagler. Posteriormente Amaral (1925), com base na variação da coloração, padrão de manchas do corpo e cabeça, bem como ocorrência geográfica, descreveu a espécie *B. neuwiedi* como sendo um complexo composto por 12 subespécies, a saber: *B. n. bolivianus*, *B. n. diporus*, *B. n. goyazensis*, *B. n. lutzu*, *B. n. matogrossensi*, *B. n. meridionalis*, *B. n. neuwiedi*, *B. n. paranaensis*, *B. n. pauloensis*, *B. n. piauhyensis*, *B. n. pubescens*, *B. n. urutu*. Todas as subespécies apresentam ampla distribuição pelas áreas abertas da América do Sul, ocorrendo no Brasil, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai.

Uma nova revisão taxonômica do complexo *neuwiedi* utilizando características morfométricas e qualitativas (padrão dos desenhos, coloração de fundo e das manchas) elevou sete das doze subespécies do complexo *neuwiedi* à categoria de espécies distintas (SILVA, 2000; SILVA, 2004; SILVA; RODRIGUES, 2008), a saber:

- *B. neuwiedi* (*B. neuwiedi goyazensis*, *B. neuwiedi paranaensis*, *B. neuwiedi meridionalis* e *B. neuwiedi urutu*);
- *B. diporus* (*B. neuwiedi diporus*);
- *B. lutzi* (*B. neuwiedi piauhyensis*; *B. iglesiais*);
- *B. matogrossensis* (*B. neuwiedi bolivianus*);
- *B. pauloensis*;
- *B. pubescens*;
- *B. marmoratus*.

Estudos realizados por Fenwick e colaboradores (2009) a partir de características morfológicas e moleculares, como análises do DNA mitocondrial de serpentes da América Sul, reclassificaram algumas serpentes antes botrópicas

como pertencendo a um novo gênero. Nessa reclassificação as espécies *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops lutzi*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops pubescens*, *Bothrops diporus*, *Bothrops matogrossensis*, *Bothrops marmoratus* e *Bothrops erythromelas* passaram a pertencer ao gênero *Bothropoides*, assim como as pertencentes ao grupo jararaca (*B. jararaca*, *B. insularis* e *B. alcatraz*).

A espécie *Bothropoides pauloensis* (**Figura 2**), anteriormente descrita como *Bothrops pauloensis*, encontra-se distribuída pelos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e provavelmente na Bolívia.

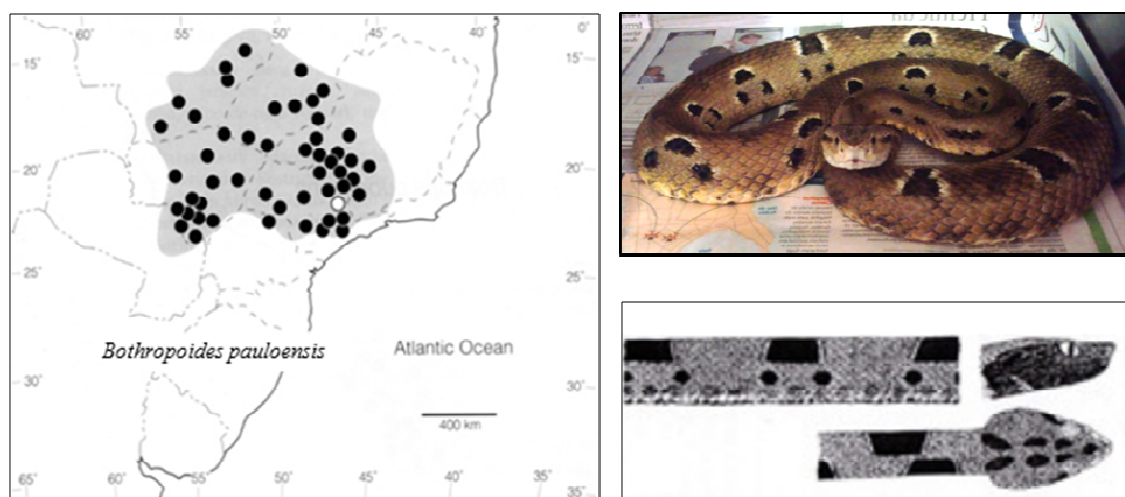


Figura 2 Distribuição geográfica, padrão de manchas da espécie *B. pauloensis* (Fonte: SILVA, 2004; CAMPELL; LAMAR, 2004; SILVA; RODRIGUES, 2008) Exemplar (Fonte: Universidade Federal de Uberlândia).

1.2. Composição da peçonha: aspectos estruturais e funcionais de seus principais componentes enzimáticos

A peçonha de serpente é uma complexa mistura farmacologicamente ativa de proteínas e polipeptídeos, produzidos e estocados em uma glândula altamente especializada. Também estão presentes citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos e em menor proporção aminoácidos livres e lipídeos (**Tabela 1**) (SOUZA et al., 2001). Após a inoculação da peçonha, essas proteínas e polipeptídeos atuam sinérgica ou individualmente, desencadeando reações fisiopatológicas como paralisia, mionecrose e/ou a morte da vítima (DOLEY;KINI, 2009; KANG et al, 2011).

Essa mistura pode sofrer alteração em sua composição associada à variação de hábitat, dieta, sazonalidade, idade e gênero dos espécimes e os mecanismos como ocorrem essa variação são pouco compreendidos (CHIPPAUX et al., 1991; MACKESSY et al., 2003; EARL et al., 2006).

A peçonha apresenta uma ação potente e letal que auxilia a serpente na captura da presa. É uma forma de incapacitar e imobilizar sua presa (função primária), e além de ser uma ferramenta para defesa contra predadores (função secundária). Existem nas peçonhas diferentes toxinas e essas podem ser divididas em um grupo de proteínas que apresentam atividades enzimáticas e há também um pequeno grupo não-enzimático (ver tabela 1). Baseada em suas estruturas, estes componentes podem ser agrupados em superfamílias de toxinas (KANG et al., 2011).

Tabela 1: Componentes das peçonhas de serpentes da família Viperidae e características química e funcionais *

Componente	Função	Atividade biológica	Massa Molecular aproximada (kDa)
Enzimas			
Fosfodiesterase	Hidrólise de ácidos nucleicos e nucleotídeos	Hipotensão; depleção de di- e trinucleotídeos	94 – 140
5'-nucleotidase	Hidrólise do 5'-nucleotídeos	Liberação nucleosídeos	53 – 82
Alcalina-fosfomonoesterase	Hidrólise das pontes de fosfomonoester	-----	90 – 110

Hialuronidase	Hidrólise do hialurônio intersticial	Diminuição da viscosidade intersticial – difusão dos componentes da peçonha	73
L-aminoácido oxidase (homodimérica)	Desaminação oxidativa dos L-aminoácidos	Indução de apoptose, danos celulares	85 – 150
Metaloproteinase Família M12 reprolisina P-III P-II P-I	Hidrólise de várias proteínas estruturais, incluindo componentes da lamina basal, fibrinogênio, etc.; Algumas são ativadores de protrombina (grupos A e B)	Hemorragia, mionecrose, predigestão da presa	43 – 85 25 – 30 20 – 24
Serinoproteinase <i>Thrombin-like</i>	Hidrólise catalítica do fibrinogênio	Rápida depleção do fibrinogênio; alteração da hemostasia	31 – 36
<i>Kallikrein-like</i>	Liberação de Bradicinina pelo Cininogênio de alto peso molecular; Hidrólise da angiotensina	Induz a rápida queda de pressão sanguínea; imobilização da presa	27 – 34
“Arginina esterase”	Atividade esterásica e peptidase	-----	25 – 36
Fosfolipase A ₂	Hidrólise	Miotoxicidade,	13 – 15

(Grupo II)	dependente de Ca^{2+} do grupo 2-acil em 3-sn-fosfoglicerídeos	mionecrose, danos na membrana lipídica	
Proteínas/Peptídeos não-enzimáticos			
Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRiSPs)	Bloqueio dos canais cNTP	Induz hipotermia	21 – 29
Fatores de Crescimento Neural	Promover o crescimento de fibras nervosas	Apoptose – incerto	14 – 32,5
PLA ₂ -neurotoxinas presinápticas (2 subunidades, ácida e básica)	Bloqueio da liberação de acetilcolina para terminais do axônio	Potente neurotoxicidade; Imobilização da presa	24
Lectinas tipo-C	Liga-se as plaquetas e ao receptor de colágeno	Anticoagulante, modulador plaquetário	27 – 29
Desintegrinas	Inibe os ligantes de integrinas	Inibição plaquetária;	5,2 – 15
Miotoxinas – não-PLA ₂	Modifica voltagem dos canais de sódio; interage com os lipídios de membranas	Mionecrose, analgesia, imobilização da presa	4 – 5,3

Peptídeos			
Peptídeos potencializadores de bradicinina	Aumenta a potência da bradicinina	Dor, hipotensão; imobilização da presa	1,0 – 1,5
Tripeptídeos inibidores	Inibição de metaloproteinases da peçonha e outras enzimas	Estabilização dos componentes da peçonha	0,43 – 0,45
Componentes Orgânicos			
Purinas e pirimidinas	Amplos efeitos em diversas células	Hipotensão, paralisia, apoptose, necrose; imobilização da presa	AMP= 0,392, hipoxantina, inosina
Citrato	Inibição de enzimas da peçonha	Estabilização da peçonha	0,192

* Modificação: Livro Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles (2010)

O conhecimento da composição protéica dessas peçonhas tem uma importância significativa, não apenas no aspecto terapêutico específico ligado a acidentes ofídicos, mas também por revelar novos componentes com potencial farmacológico, os quais podem se tornar valiosos instrumentos de pesquisa nas diversas áreas do conhecimento.

Dentre as diversas proteínas com atividade enzimática isoladas de peçonhas botrópicas destacam-se as: L-aminoácido oxidases (LAO), fosfolipases A₂, serinoproteinases e metaloproteinases, cujas estruturas e mecanismos de ação vêm sendo elucidados por diferentes métodos. Estudos proteômicos e transcriptômicos revelaram que dentre as toxinas com alta atividade enzimática as metaloproteinases são as mais expressas em serpentes

viperídeas, responsáveis pela hemorragia causada pela “picada”. Neste sentido, Núñez e colaboradores (2009) assim como Valente e colaboradores (2009) demonstraram os perfis de RNAs transcritos e protéico das peçonhas de *B. insularis* e *B. atrox* (Figura 3 A e B) onde as metaloproteinases foram predominantes.

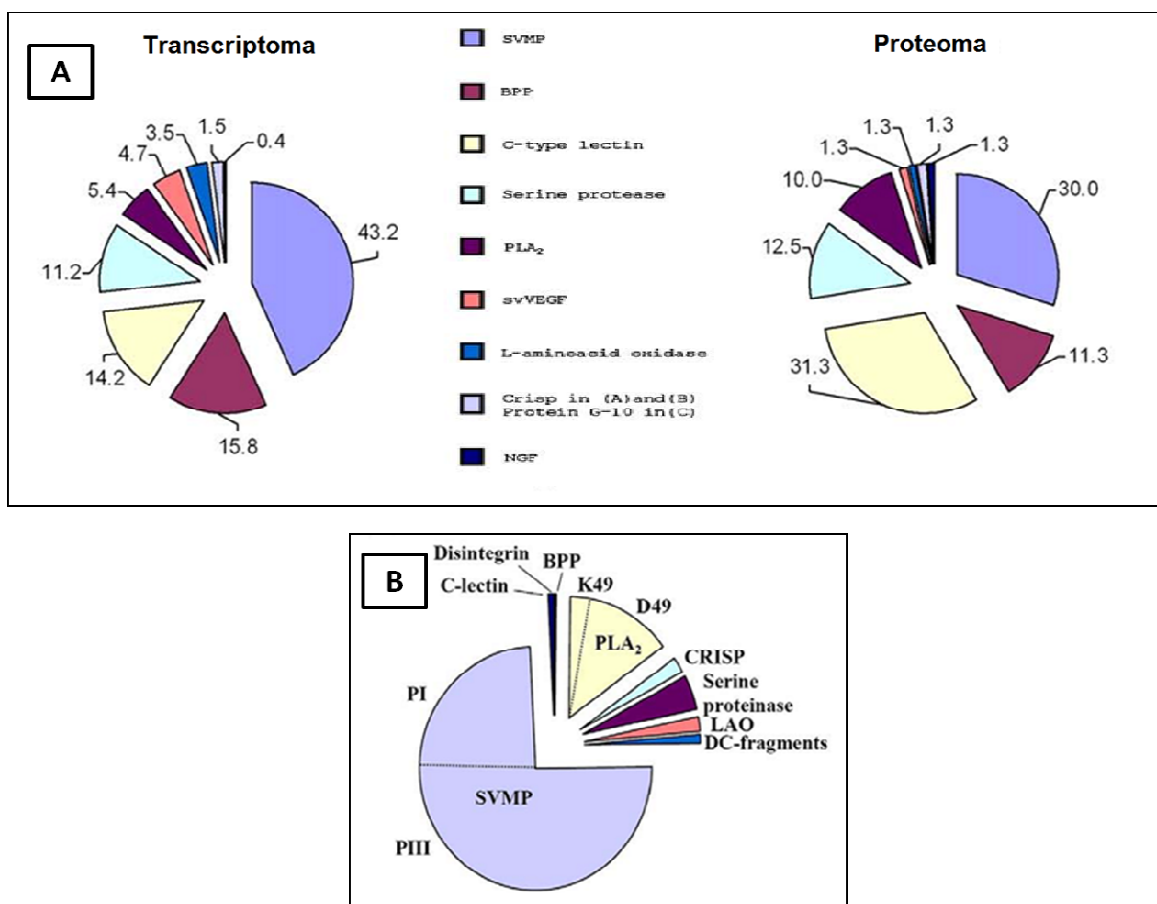


Figura 3 Análise venômica de peçonhas botrópicas. A: *B. insularis*; B: *B. atrox*- perfil proteômico. Fonte: NÚÑEZ et al., 2009; VALENTE et al., 2009.

As L-aminoácido oxidases (LAAOs – EC 1.4.3.2) são encontradas em peçonhas de serpentes Viperidae e Elapidae (DU; CLEMETSON, 2002). Estas proteínas são flavoenzimas e catalisam a desaminação dos L-aminoácidos a α -cetoácidos, tendo como subprodutos amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

As LAAOs são glicoproteínas ligantes de Flavina Adenina Dinucleotideo (FAD) ou Flavina Mononucleotídeo (FMN), homodiméricas com massa entre 110-150 kDa (ZULIANI et al. 2009). E exibem preferência por aminoácidos aromáticos

e hidrofóbicos como a fenilalanina e a leucina (KANG et al., 2011). Vários estudos indicam que as LAAOs exercem um papel fundamental na toxicidade da peçonha, porém os mecanismos pelos quais atuam ainda não foram esclarecidos. Alguns sugerem que essas enzimas sejam responsáveis pela inibição da agregação plaquetária (SAKURAI et al., 2001; TAKATSUKA et al., 2001), e outros que a agregação plaquetária e o efeito bactericida ocorram em função da produção do H_2O_2 (LU et al., 2002; STABELI et al., 2004).

Dentre essa variedade de enzimas que compõem a peçonha, podemos destacar as fosfolipases A_2 (PLA_2) que possuem a função de catalisar a hidrólise de fosfolipídios de membrana, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos podendo causar fortes danos em tecidos biológicos (HIGUCHI et al., 2007).

As fosfolipases A_2 (PLA_2 , EC 3.1.1.4) podem ser encontradas em diversos sistemas biológicos. Representam uma superfamília dividida em 15 grupos de enzimas que por sua vez estão divididas em 5 classes diferentes: PLA_2 secretória, PLA_2 citosólica, PLA_2 independente de Ca^{2+} , PLA_2 associada a lipoproteína e acetil-hidrolase/fator de agregação plaquetária (PAF) (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As fosfolipases A_2 de peçonhas de serpentes se encontram na classe das PLA_2 secretórias inseridas nos grupos GI (provenientes de peçonhas de Elapidae) e GII (peçonha de Viperidae). Apresentam massa molecular variando entre 14 a 18 kDa e possuem 5 a 8 pontes dissulfeto em sua estrutura. As PLA_2 s de peçonhas da família Viperidae da classe II são subdivididas em dois grupos: Asp49 e Lys49. As Asp 49 são assim chamadas porque possuem um resíduo de aspartato na posição 49, apresentando alta atividade catalítica sobre substratos artificiais e as Lys 49 possuem um resíduo de lisina na posição 49, apresentando pouca ou nenhuma atividade catalítica (ARNI; WARD, 1996; OWNBY et al, 1999; SOARES et al, 2004). A troca de aminoácidos aspartato (Asp) por lisina (Lys) é suficiente para causar a perda da habilidade da proteína em se ligar no cálcio (Ca^{2+}), um cofator essencial para fazer com que a enzima expresse sua atividade catalítica.

As PLA_2 de peçonha de serpentes vêm sendo amplamente estudadas devido à variedade de seus efeitos farmacológicos, tais como neurotoxicidade, mionecrose, cardiotoxicidade, atividade hemolítica, hemorrágica, hipotensora,

inibição da agregação plaquetária e anti-coagulação (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; OWNBY, 1998; OWNBY et al., 1999). Essas atividades se relacionam com a atividade enzimática ou podem ser totalmente independente dela (KINI; EVANS, 1989, KINI, 1997).

As peçonhas botropóicas e botrópicas são ricas em enzimas proteolíticas, tais como serinoproteinases e metaloproteinases. As serinoproteinases (*Snake Venom SerinoProteases- SVSP*) são enzimas que afetam o sistema hemostático das vítimas de acidentes ofídicos, podendo alterar a agregação plaquetária, a coagulação sanguínea, a pressão sanguínea e a fibrinólise (MARKLAND, 1998).

As serinoproteinases presentes nos mais diversos organismos têm um papel fundamental em diversos processos biológicos, controlando a digestão e regulando o processo hemostático, sistema imune e inflamatório (KANG et al., 2011). Estão agrupadas em seis principais Clans e subsequentemente divididas em famílias que apresentam similaridades em suas funções e sequências (RAWLINGS et al., 2010). As serinoproteinases presentes nas peçonhas de serpentes viperídeas, elapídeas e colubrídeas (SERRANO; MAROUN, 2005) pertencem ao clan PA e exclusivamente à família S1 das serinoproteinases similares a tripsina (PAGE; Di CERA, 2008). E assim como a tripsina apresentam uma tríade catalítica formada pela His57-Asp102-Ser195 (Figura 4).

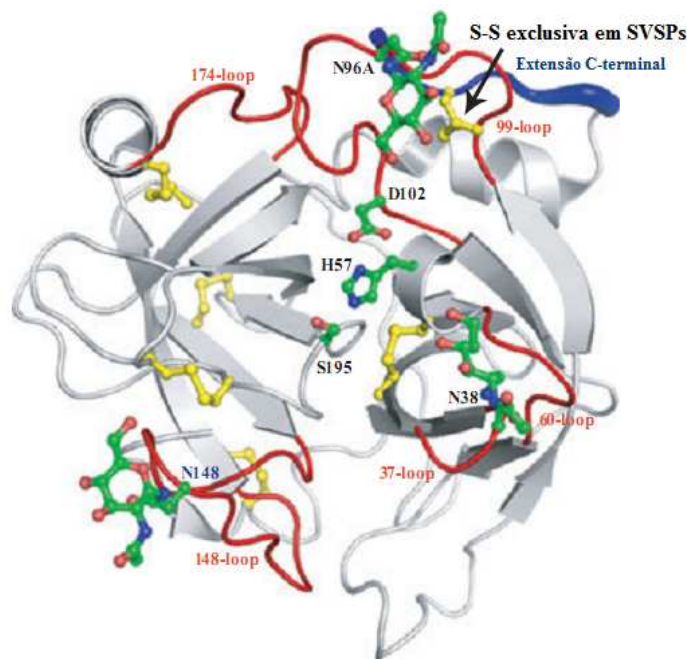


Figura 4 Representação estrutural das serinoproteases de peçonhas de serpentes. Fonte: KANG et al., 2011.

Sua estrutura apresenta 12 resíduos de cisteínas, dos quais 10 estão pareados formando pontes dissulfeto, como a tripsina. Os resíduos cisteína remanescentes formam uma ponte dissulfeto na porção C-terminal (Figura 4), exclusiva das SVSPs, que é considerada importante para manter a estabilidade estrutural e a regulação alostérica (MURAKAMI; ARNI, 2005; SERRANO; MAROUN, 2005).

As SVSPs são sintetizadas como zimogênios com aproximadamente 260 aminoácidos. Apresentam em suas estruturas pontos de glicosilação que lhes conferem uma variação na massa molecular entre 26 e 67kDa. Apesar das SVSPs apresentarem similaridades estruturais com identidade entre suas sequências de 50-80%, elas podem exibir funções e especificidades diferentes (SERRANO; MAROUN, 2005). Assim, as SVSPs podem ser agrupadas em (a) enzimas coagulantes do fibrinogênio (“thrombin-like”), (b) ativadores de plasminogênio (PA), (c) cininoliberadores (Kallikrein-like) (WANG et al., 2001).

Serinoproteases de peçonhas de serpentes pertencem a uma grande família de peptidases responsáveis pelas alterações no sistema hemostático. Algumas dessas enzimas são denominadas “thrombin-like” por serem capazes de clivar o fibrinogênio, mas apesar de possuírem uma ação semelhante à trombina,

ocasionam apenas a formação de um coágulo frouxo, por não serem capazes de ativar o fator XIII, responsável pela estabilização do coágulo de fibrina (BRAUD et al, 2000).

A sequência motivo do sítio ativo é altamente conservada nas serinoproteinases de peçonhas ofídicas com ação semelhante à trombina (SVTLEs), no entanto, existem algumas diferenças no que diz respeito à especificidade da atividade catalítica sobre o fibrinogênio, quando comparadas com a trombina. Algumas SVTLEs clivam ambas as cadeias do fibrinogênio, $A\alpha$ e $B\beta$, liberando fibrinopeptídeos A (FpA) e fibrinopeptídeos B (FpB), mas a maioria delas atuam preferencialmente em apenas uma das cadeias do fibrinogênio $A\alpha$ ou $B\beta$ (PIRKLE, 1998; MARKLAND, 1998; MATSUI et al., 2000; BORTOLETO et al., 2002).

SVTLEs possuem diferentes atividades biológicas no sistema hemostático e vale dizer que elas também podem atuar em outros processos, como nos sistemas complemento, nervoso e renal (TORRENT et al., 2007). Contudo, a literatura mostra que as SVTLEs são extremamente diversas podendo apresentar atividades específicas próprias o que as tornam importantes ferramentas para a investigação de mecanismos biológicos.

1.3. Estrutura e função de Metaloproteinases

Metaloproteinases são enzimas hidrolíticas do tipo endopeptidases (E.C.3.4.2.4) que dependem da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico para manifestação de suas atividades. Estas enzimas variam amplamente em filogenia (de bactérias até mamíferos) e nas suas atividades *in vivo* (BLUNDELL 1994). De acordo com similaridades estruturais, as metaloproteinases zinco dependentes são classificadas em quatro grupos distintos (HOOPER 1994): 1- **Zincinas**: contém a sequência conservada **HEXXH**, como motivo de ligação ao zinco; 2- **Inverzincinas**: possuem o domínio Zincina invertido (**HXXEH**) de ligação ao zinco; 3- **Carboxipeptidase**: que possui o motivo de ligação ao zinco, **HXXE**; e 4- **DD-carboxipeptidase**: que apresenta o motivo de ligação ao zinco **HXH**. Para ligação ao metal, todos os grupos

possuem como 1º e 2º ligantes resíduos de histidina, exceto as carboxipeptidases. Já o terceiro ligante pode ser um resíduo de histidina (exceto nas inverzincinas) ou um ácido glutâmico (zincinas e inverzincinas). O maior grupo é representado pelas Zincinas, subdivididas em Gluzincinas (aquelas em que o terceiro ligante do zinco é o ácido glutâmico) e Metzincinas (cujo terceiro ligante do zinco é uma histidina).

O grupo das gluzincinas é composto pelas famílias das termolisina, endopeptidase-24.11, aminopeptidase, enzima conversora angiotensina, endopeptidase-24.15 e neurotoxinas do tétano e do botulismo.

As Metzincinas são subdivididas em Astacinas (encontradas em crustáceos), Serralisinas (encontradas em bactérias), Matrixinas (encontradas na matriz extracelular de mamíferos), Leishmanolisinas e Pappalisinas), Reprolisinas (presentes nas peçonhas de serpentes, as proteínas reprodutivas de mamíferos – ADAMs e ADAMTs (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*) (BODE et al, 1993; HOOPER, 1994; STÖCKER et al, 1995; MATSUI et al, 2000; FOX; SERRANO, 2005; WANG et al, 2005; GOMIS-RUTH, 2009)

As metaloproteinases da família “Metzincin” são dependentes de zinco e possuem um resíduo de metionina em comum na volta abaixo do sítio ativo e um segmento em hélice carboxi-terminal, contendo dois ou três resíduos de histidina envolvidos no sítio de ligação do zinco. A volta de metionina forma uma base hidrofóbica sob o centro ativo da hélice e da cavidade de ligação do substrato. O sítio ligante de zinco possui uma sequência de aminoácidos comum nos diferentes membros desta família de metaloproteinases, HEBXHXBGBXH, onde H é uma histidina, E é o ácido glutâmico, G é a glicina, B é qualquer resíduo hidrofóbico, X é qualquer aminoácido (**Figura 5**).

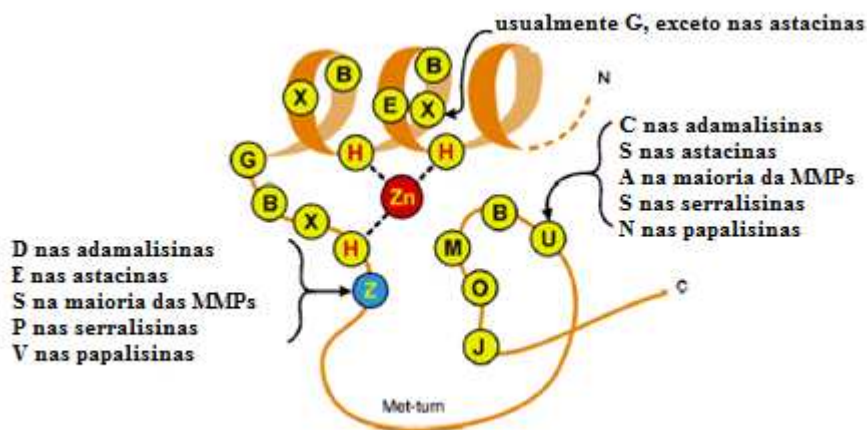


Figura 5 Representação esquemática da estrutura do sítio ativo das metaloproteínas da família das metzincinas (STOCKER ; BODE, 1995)

As metaloproteínas são secretadas como zimogênios e são ativadas geralmente por hidrólise de um pró-domínio através de um mecanismo *cisteína switch*. Neste mecanismo, o grupo tiol de um resíduo de cisteína presente numa sequência altamente conservada (PKMCGVT), adjacente ao domínio protease, está coordenado ao íon zinco do sítio ativo, dessa forma bloqueando a função enzimática. O complexo simultaneamente bloqueia o sítio ativo e provavelmente exclui a água da esfera de coordenação do átomo de zinco. Todas as zinco hidrolases ativas possuem uma molécula de água como um quarto ligante que é essencial para a catálise.

O domínio catalítico da protease é representado pelo zinco catalítico ligado por três resíduos de histidina presentes na sequência de consenso HEXXHXXGXXH formando um sítio ativo em hélice. A porção N-terminal da protease madura começa na alça à esquerda da molécula. No modelo de zimogênio a região N- terminal é alongada por um pró-peptídeo que possui a sequência PKMCGV, onde o grupo tiol de uma cisteína se liga ao zinco do sítio catalítico. A interrupção da interação cisteína-zinco causa ativação da molécula, mecanismo conhecido como *cisteína-switch*. A ativação fisiológica das metaloproteases é provavelmente iniciada por proteases que clivam sítios específicos dentro do propeptídeo, mas a ativação final das metaloproteínas para a forma madura requer a retirada do propeptídeo inteiro por um mecanismo de autólise (MATRISIAN, 1992; GRAMS et al., 1993). Estas metaloproteínas

também podem ser ativadas por agentes oxidantes, surfactantes, metais pesados, entre outros, que modificam o resíduo de cisteína e dessa forma promovem a desestabilização da ligação do zinco com o grupo tiol da cisteína ativando a enzima (SPRINGMAN et al., 1990).

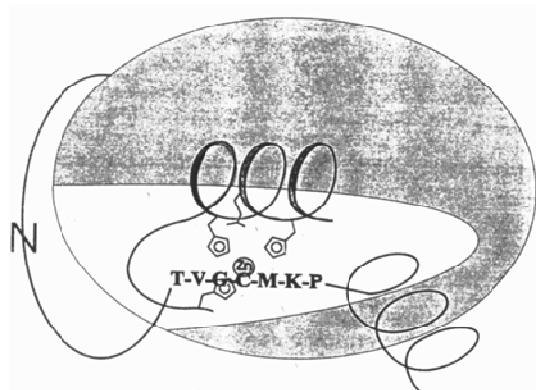


Figura 6 Modelo de zimogênio da adamalisina uma metaloproteínase isolada do veneno da serpente *Crotalus adamanteus* (GRAMS et al., 1993).

1.3.1. Metaloproteínases de peçonhas de serpentes (SVMPs – Snake Venom Metalloproteinases)

As metaloproteínases de venenos de serpentes (SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases*) compreendem um amplo grupo de proteínas da família zinco dependentes, que juntamente com as ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) e as ADAMTs (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*) pertencem à subfamília das Reprolisinas. Essas enzimas apresentam grande homologia no domínio metaloproteínase e em alguns casos, nos domínios localizados na porção carboxi-terminal subsequente (FOX; SERRANO, 2008).

Estima-se que no mínimo 32% das proteínas presentes nas peçonhas viperídicas sejam metaloproteínases (FOX; SERRANO, 2008). Essas enzimas são responsáveis pelas alterações no sistema hemostático e por causar hemorragias locais e sistêmicas. Atuam na degradação dos componentes da membrana basal vascular, que leva ao extravasamento sanguíneo. Essas toxinas são responsáveis por outros efeitos (como edema, necrose, apoptose e

inflamação) que caracterizam a lesão tecidual após o envenenamento (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MATSUI et al., 2000; LAING et al., 2003; GUTIÉRREZ et al., 2005).

Em geral, a ação *in vitro* das SVMPs está relacionada à proteólise dos componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina), proteínas do plasma (fibrinogênio, fibrina, fator de Von Willenbrand, protrombina) e proteínas da superfície celular (integrinas e caderinas). Além disso, SVMPs são capazes de interagir com receptores das plaquetas, de células endoteliais e fibroblastos, ativando ou inibindo a resposta celular (WHITE, 2005; MOURA-DASILVA et al., 2007). Esses efeitos podem resultar em várias alterações fisiopatológicas tais como inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e principalmente hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 2005).

1.3.1.1. Domínios estruturais e classificação das SVMPs de serpentes

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

O **Peptídeo sinal** (P) é constituído por uma sequência de 18 resíduos de aminoácidos, em sua maioria hidrofóbicos, e que provavelmente direciona a proteína sintetizada no retículo endoplasmático (RE) (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; FOX; SERRANO 2008).

O **Pró-domínio** é composto por 200 resíduos de aminoácidos que são extremamente conservados nos integrantes das SVMPs. Essa região é responsável por modular a atividade enzimática desse grupo. Através do mecanismo “cysteine-switch” ou “Velcro”, proposto por Grams e colaboradores (1993), o motivo PKMCGVT interage com sítio ativo bloqueando-o (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

Domínio **Metaloprotease** ou **catalítico** apresenta uma sequência de 200 a 210 resíduos de aminoácidos. Nesse domínio está presente o motivo ligante de zinco, HEXXHXXGXXH, e a sequência CIMXP onde se encontra um resíduo de metionina Met 166 (*met-turn*) que provavelmente seja responsável por manter a estabilidade da estrutura para favorecer a ligação do zinco (Figura 7A) (FOX; SERRANO, 2005; RAMOS; SELISTRE, 2006)

O domínio catalítico das SVMPS apresenta duas sequências de consenso (H₁₄₂E₁₄₃XXH₁₄₆XXG₁₄₉XXH₁₅₂ e A₉₅Q₉₆L₉₇L₉₈T₉₉), bem como resíduos de cisteínas conservados Cys (117, 157, 159, 164, 181) os quais podem estar envolvidos em ligações dissulfeto (WATANABE et al., 2003; AKAO et al., 2010). A estrutura tridimensional da metaloprotease Adamalisina II de *Crotalus adamanteus* resolvida por difração de raios-X a 2.0Å de resolução (GOMIS-RÜTH et al., 1994) (Figura 7A), mostra os três resíduos de histidina (142, 146, 152) ligados ao íon zinco catalítico. Topologicamente, o domínio catalítico das SVMPS são classificados como proteínas α/β com aparência de um *open-sandwich*, sendo a estrutura terciária composta por um subdomínio maior (N-terminal) o qual possui 4 α -hélices e 5 folhas β e um subdomínio menor (C-terminal) o qual é formado por uma única α -hélice e vários *loops*. Estes subdomínios são separados por um canal hidrofóbico onde se localiza o sítio ativo e unidos por duas ou três pontes dissulfeto (GOMIS-RÜTH et al., 1994; WATANABE et al. 2003).

A catálise enzimática das SVMPS, revelada por estudos estruturais, demonstram que a presença de uma molécula de água localizada entre o grupo carboxílico do Glu335 catalítico e o íon zinco provoca um aumento da polarização na região do sítio catalítico, isto possibilita a transferência de um próton da molécula de água para o Glu335, o qual se torna um nucleófilo e ataca o grupo carbonil da ligação peptídica do substrato levando o íon zinco a um estado de transição penta-coordenado. Com a transferência do próton do Glu para o nitrogênio da ligação peptídica do substrato, o mesmo é clivado liberando os subprodutos da reação, a enzima é regenerada com a incorporação de uma nova molécula de água (STOCKER et al., 1995; RAMOS; SELISTRE,

2006).

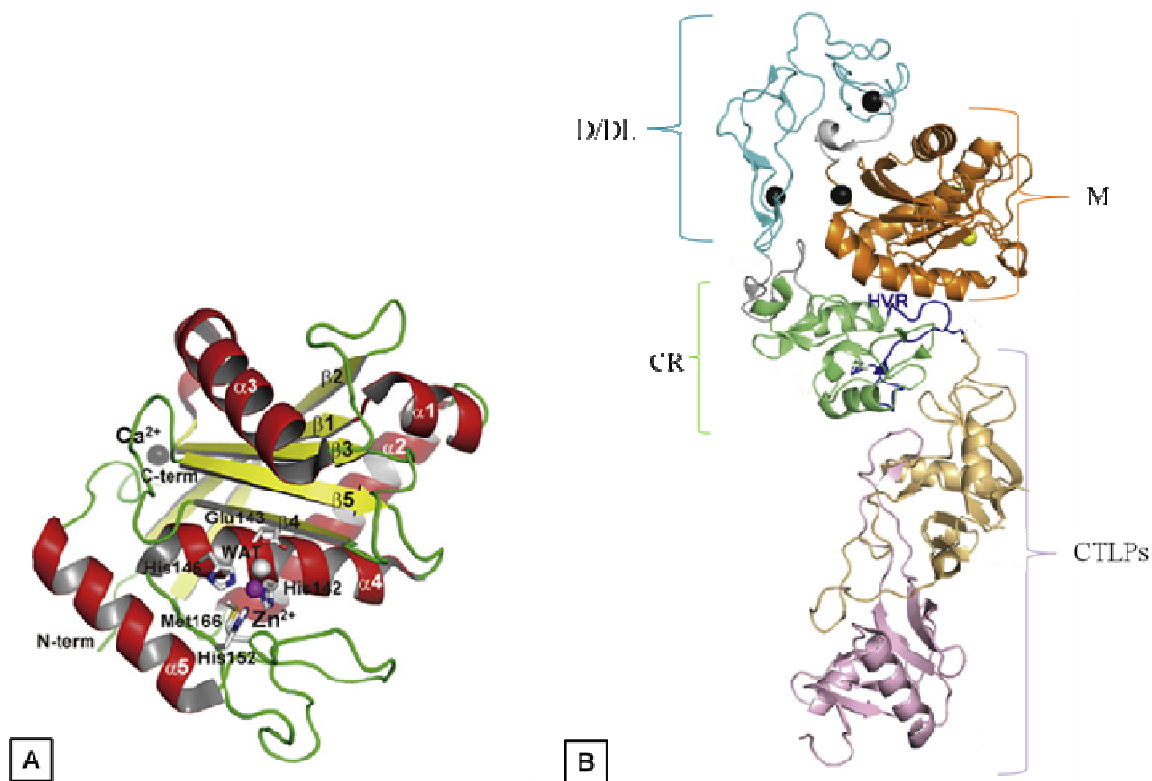


Figura 7 Metaloproteinases de peçonha de serpentes. **A:** Representação estrutural da SVMP-PI Adamalysina II. Íons de zinco, cálcio e molécula de água, são representadas por esferas roxa, cinza escuro e cinza, respectivamente; **B:** Estrutura de SVMP-PIII – RVV-X, e seus respectivos domínios, M (metaloprotease), D/DL (desintegrina/semelhante a desintegrina), CR (rico em cisteína) e CTLPs (proteínas semelhantes à lectinas tipo-C). Fonte: TAKEDA et al., 2011.

Interdomínio – segmento com 13-15 resíduos de aminoácidos que se encontra entre os domínios metaloproteinase e desintegrina/semelhante à desintegrina. Em algumas SVMPs esse segmento apresenta um resíduo de cisteína que participa da formação de uma ponte dissulfeto com o domínio adjacente (ex.: bitistatina -1, catrocolastatina-C), e atua contra o processamento proteolítico (ex.: Jerdonitina) (FOX; SERRANO, 2005; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006). Estudos com peptídeo sintético correspondente ao segmento mostraram que esse interdomínio não contribui para a toxicidade da peçonha (KINI et al., 1997).

Os domínios **Desintegrina** e **semelhante a desintegrina** – podem variar de 41 a 100 resíduos de aminoácidos e contém pontes de dissulfeto em sua

estrutura (Figura 7B) (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006). As desintegrinas e as proteínas similares presentes nas peçonhas de serpentes são provenientes do processamento proteolítico das metaloproteinases pertencentes à classe PII e PIII, respectivamente, e apresentam alto potencial farmacológico por inibir a interação integrinas-ligante (KINI;EVANS, 1992). As desintegrinas encontradas nas peçonhas de serpentes podem apresentar diferentes motivos que interagem com diferentes tipos de integrinas.

O domínio **Rico em Cisteína** – formando por 112 resíduos de aminoácidos, nas SVMPs está localizada na porção C-terminal do domínio desintegrina.

O domínio **semelhante a lectina tipo-C** (CTLPs) – são domínios encontrados em dois membros das metaloproteinases – RVV-X (ativador do fator X, proveniente da peçonha de *Daboia russelii*) (Figura 7B); VLFXA (ativador do fator X de *Vipera lebetina*).

As SVMPs possuem massa molecular variando entre 20 a 100 kDa e foram inicialmente divididas em 4 classes de acordo os domínios estruturais (BJARNASON; FOX, 1994). As proteínas pertencentes à classe PI apresentam pouca ou nenhuma atividade hemorrágica, massa molecular de 20-30 kDa e 3 domínios estruturais: peptídeo sinal, pró-domínio e o domínio metaloproteinase. Na classe PII encontram-se enzimas de massas moleculares de 30-60 kDa que possuem além dos 3 domínios anteriores apresentam um domínio desintegrina na região C-Terminal. A classe PIII compreende a metaloproteinases com alta atividade hemorrágica e massa molecular de 60-80 kDa que possuem além do domínio semelhante à desintegrina, um domínio rico em resíduos de cisteína. A classe PIV é formada por toxinas de alta massa molecular 80-100 kDa e possuem um domínio adicional ligante de lectina tipo C, como mostra a figura 8 (BJARNASON; FOX, 1994).

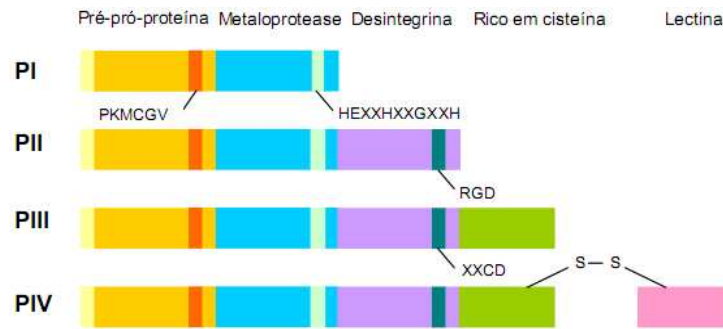


Figura 8 Diagrama esquemático da divisão das metaloproteínas de peçonha de serpentes.

Fonte BJARNASON; FOX (1994).

Em 2005, Fox e Serrano adaptaram o esquema de classificação originalmente proposto para as SVMPs e incluíram as seguintes classes precursoras de metaloproteínas: PIIa-II, precursores de metaloproteínas que não sofrem processamento proteolítico para liberar o domínio desintegrina; precursores PIIb-II, que se encontram na forma dimérica; precursores D-I que não contêm o domínio metaloprotease; precursores PIIIa-PIII que liberam seus domínios desintegrina e o domínio rico em cisteína e por fim a classe de precursores PIIIb-PIII que formam SVMPs diméricas (Figura 9).

2 domínios lectina tipo-C conectados por ligações dissulfeto) (FOX;SERRANO, 2008).

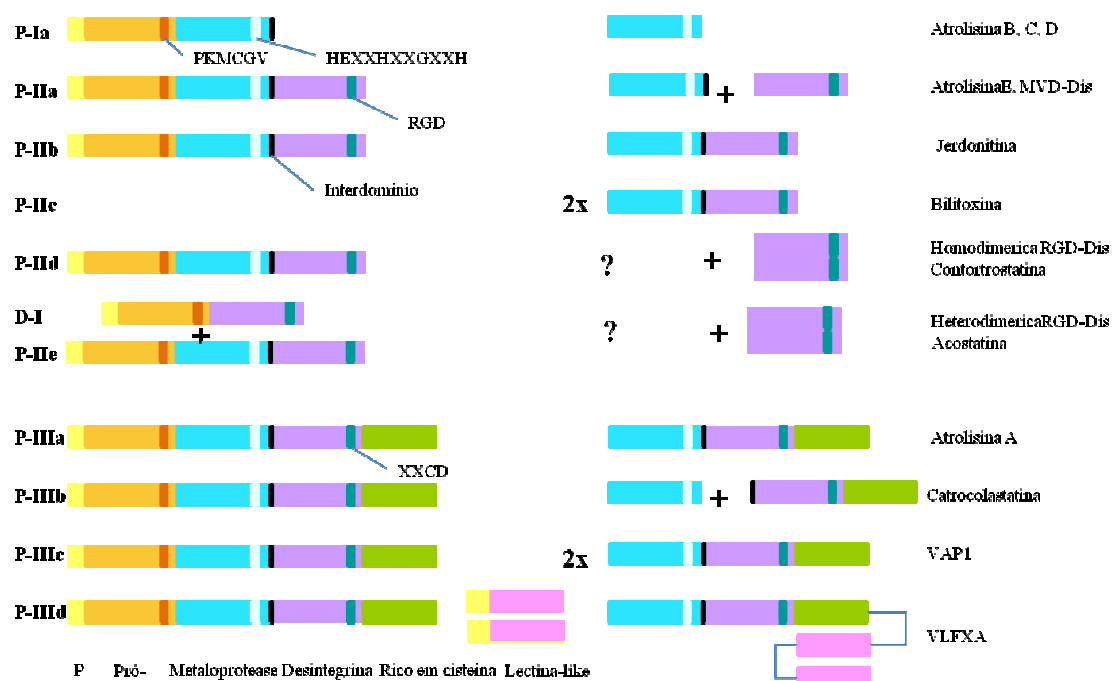


Figura 10 Classificação de metaloproteínas de peçonha de serpentes. Fonte: Adaptação de Fox e Serrano (2008).

1.3.1.2. Hemostasia e SVMPs

A manutenção da fluidez do sangue dentro do sistema vascular é um importante processo fisiológico. O termo hemostasia refere-se à resposta normal do vaso à injúria, formando um tampão que funciona limitando a hemorragia. Trombose é a formação de um tampão patológico que se origina quando a hemostasia é excessivamente ativada na falta de sangramento (hemostasia no local incorreto). Os componentes essenciais para fluidez, hemostasia e trombose são os fluxos sanguíneos produzidos pelo ciclo cardíaco, o endotélio vascular e pelo próprio sangue (RASCHÉ, 2001).

No caso de injúria vascular traumática com ruptura de endotélio, a ativação plaquetária e fatores de coagulação estimulam uma resposta vigorosa (ROSENFELD; GRALNICK, 1997). As plaquetas ancoram no subendotélio por ligações formadas entre moléculas de adesão celular/receptores adesivos e

ligantes adesivos/contra-receptores no sangue e tecidos conectivos. Uma vez aderidas ao subendotélio, as plaquetas se espalham sobre a superfície e, plaquetas adicionais, as quais chegam pelo fluxo sanguíneo, se aderem inicialmente à camada basal e depois umas as outras por pontes interplaquetárias formadas pelo fibrinogênio, formando um tampão de agregado de células (primeira fase da hemostasia) (RASCHE, 2001).

A agregação plaquetária requer ativação via adenosina difosfato, o qual é liberado por organelas de armazenamento da plaqueta. A formação de fibrina representa a segunda fase da hemostasia. Ela é desencadeada por fatores procoagulantes (ex: fibrinogênio, fator V, fator de von Willebrand) secretados pelas plaquetas, por fatores teciduais, considerados componentes críticos dos elementos vasculares, (via extrínseca), e por ativação por contato (via intrínseca) do sistema de coagulação. Uma vez formado o fator Xa, ele converte protrombina em trombina (via comum), o que induz a transformação de moléculas de fibrinogênio em fibrina.

O fibrinogênio é uma molécula essencial na hemostasia, alvo de diversos componentes presentes nas peçonhas de diferentes animais. A molécula de fibrinogênio consiste em um dímero de protômeros triméricos, com cada protômero consistindo em três cadeias polipeptídicas não idênticas, porém homólogas, α , β e γ , (Figura 11).

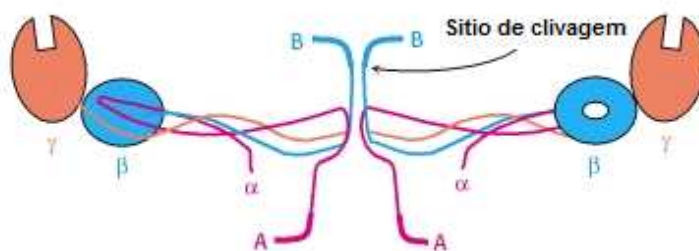


Figura 11 Estrutura do fibrinogênio. Fonte: BERG et al., 2002.

Na ação da trombina sobre o fibrinogênio, há liberação de fibrinopeptídeos A e B gerando os monômeros de fibrina. Os monômeros de fibrina ligam-se longitudinalmente e lateralmente formando os polímeros de fibrina. Essa fibrina

formada é conhecida por fibrina solúvel porque os monômeros que a formam estão ligados por pontes de hidrogênio. Com esse tipo de ligação, a fibrina dissolve-se facilmente em solução de uréia. Nesse ponto, é importantíssima a atuação do FXIIIa pois, graças a esse fator, os monômeros de fibrina ficarão ligados covalentemente, o que confere insolubilidade à fibrina (MURRAY, 2006; VOET, 2006; SMITH et al., 2007).

As membranas das plaquetas possuem sítios para empacotamento ordenado de proteínas ativas de coagulação (fator V e VIII) que as estimula para gerar trombina em altos níveis. A malha de fibrina liga as plaquetas umas as outras contribuindo para a sua agregação ao dano do vaso, mediada pela ligação das glicoproteínas receptoras das plaquetas e pela interação com outras proteínas adesivas como a trombospondina, fibronectina e vitronectina (RASCHE, 2001).

O tampão hemostático definitivo que sela a hemorragia é um trombo de fibrina e plaquetas. Uma sobrecarga de trombose induzida pela ativação da hemostasia fora da região vascular lesionada é controlada por fatores de diluição do sangue circulante, pela capacidade anti-trombótica do sistema hemostático e por ativação local da fibrinólise (terceira fase da hemostasia) (RASCHE, 2001).

As SVMPs podem interferir na hemostasia por diferentes mecanismos, elas podem ser classificadas em enzimas procoagulantes ou anticoagulantes. As enzimas procoagulantes podem levar a ativação da protrombina e dos fatores X, V, IX. As anticoagulantes compreendem enzimas que podem agir sobre plaquetas e fibrinogênio (MATSUI et al., 2000; RAMOS et al., 2006).

As enzimas que apresentam ação fibrinogenolítica encontradas nas peçonhas de serpentes podem ser classificadas em três grupos de acordo com a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio. O primeiro grupo das fibrinogenases presentes nas peçonhas são aquelas com especificidade pela cadeia A α do fibrinogênio, apresentam pontes dissulfeto que são importantes para sua estrutura e função e aparentemente, degradam primeiro a cadeia A α do fibrinogênio e depois a B β , elas são representadas pelas SVMPs. O segundo grupo das fibrinogenases de peçonhas são aquelas com especificidade pela cadeia B β do fibrinogênio. Essas enzimas são serino- proteases. O terceiro grupo das fibrinogenases de peçonhas são aquelas com especificidade pela cadeia γ do

fibrinogênio. Esse tipo de fibrinogenase é bastante rara, tendo sido purificada a partir da peçonha de *Crotalus atrox* (toxina hemorrágica) (NIKAI et al., 1984; MARKLAND, 1991).

De uma forma geral, as principais atividades das SVMPs sobre a hemostasia são mediadas pela atividade proteolítica do domínio metaloproteinase e ações anti-adesivas dos domínios desintegrina, *desintegrina like* e rico em cisteína. Vários trabalhos têm demonstrado a ação de SVMPs sobre proteínas do sistema hemostático (ex.: fibrinogênio, fator X, protrombina), a saber: Da peçonha de *Echis carinatus* foram isolados dois ativadores de protrombina, a Ecarina (MORITA; IWANAGA, 1981; NISHIDA et al., 1995) e a Carinactivase (YAMADA et al., 1996). Adamalisina II, uma SVMP-PI não hemorrágica isolada da peçonha de *Crotalus adamanteus* é responsável por inativar as proteases presentes no plasma como a antitrombina III (KRESS; PAROSKI, 1978). Diversas SVMPs PIII estão relacionadas com a inibição da agregação plaquetária que agrava a hemorragia. Uma delas é a jararagina uma SVMP PIII proveniente de *B. jararaca* responsável pela degradação do receptor de colágeno nas plaquetas (integrina $\alpha 2\beta 1$) (KAMIGUTI, 2005). Outros receptores como GPIIb e GPVI também podem ser degradados por metaloproteinases presentes em peçonha (ex.: crotalina, mocaragina, crotaragina, alboragina) (WARD et al., 1996; WU et al., 2001; WIJEYEWICKREMA et al., 2007).

As SVMPs têm potencial biotecnológico de aplicação em medicina no tratamento de desordens hemostáticas. SVMPs fibrinogenolíticas não hemorrágicas podem ser exploradas como agentes trombolíticos para dissolução de trombos (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

Assim, metaloproteinases são ótimas ferramentas a serem usadas em estudos moleculares, e podem ser utilizadas na produção de fármacos.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAO, P.K.; TONOLI, C.C.C.; NAVARRO, M.S.; CINTRA, A.C.O.; NETO, J.R.; ARNI, R.K.; MURAKAMI, M.T., Structural studies of BmooMP α -I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, v. 55, p. 361-368, 2010.

ARNI, R. K; WARD, R. J. Phospholipases A₂- A structural review. **Toxicon** v. 34, p 827-41, 1996.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, p.325-372, 1994.

BLUNDELL, T.L. Metalloproteinase superfamilies and drug design. **Nature Structural Biology**, v.1, p.73-75, 1994.

BODE,W.; GOMIS-RUTH, F.X.; STÖCKLER, 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 'metzincs'. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, v. 331, p. 134-140, 1993.

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

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

CAMPBELL, J.A., LAMAR, W.W. 2004. **The venomous reptiles of Latin American**. Ithaca-New York, Comstock, v.2, 870p.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279-1303, 1991.

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

DOBROVOLSKY, A.B.; TITAEVA, E.V. The fibrinolysis system: Regulation of activity and physiologic functions of its main components. **Biochemistry**, p. 67-99, 2002.

DOLEY, R.; KINI, R.M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 2851-2871, 2009.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neuroscience**, p. 16-99, 1993.

DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, p. 659-665, 2002.

EARL, S. T.; BIRRELL, G. W.; WALLIS, T. P.; PIERRE, L. D. St.; MASCI, P. P.; de JERSEY, J.; GORMAN, J. J. ; LAVIN, M. F. Pos-translational modification accounts for the presence of varied forms of nerve growth factor in Australian elapid snake venoms. **Proteomics**, v. 6, p. 6554-6565, 2006.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L.; 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**, v. 156, p. 617-640, 2009.

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

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**, v.275, p 3016-3030, 2008.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos . **Ministério da Saúde-Brasil**. 112 pp, 2001.

GOMIS-RÜTH, F.X.; KRESS, L.F.; 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. **Journal Molecular Biology**, v.239, p. 513-544, 1994.

GOMIS-RÜTH, F.X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. The **Journal Biological Chemistry**, v. 23, p. 15353-15357, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini Rm, editor. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. **Chichester: Wiley & Sons**, p. 321-52, 1997.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841 – 850 , 2000.

GUTIERREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage, **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

GRAMS,R.; HUBER,R.; KRESS,L.F.; MORODER,L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinase by a cysteine switch-like mechanism. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, v. 335, p. 76-80, 1993.

HIGUCHI, D.A.; BARBOSA, C.M.V.; BINCOLETTO, C.; CHAGAS, J.R.; MAGALHÃES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; PESQUERO, J.L. Purification and partial characterization of two phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319-328, 2007.

HOOPER, N. Families of zinc metalloproteases. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, v.354, p. 182-191, 1994.

KAMIGUTI, A.S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 1041-1049, 2005.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**), doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x

KASTURIRATNE,A.; WICKREMASINGHE, R. A.; de SILVA, N.; GUNAWARDENA; N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; SILVA, H.J. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLOS Medicine** 5(11): e218.doi:10.1371/journal.pmed.0050218

KINI, R. M. Phospholipase A₂ – a complex multifunctional protein puzzle.1997, In *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism* (Kini, R.M., ed), John Wiley, Chichester, 1p.

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

KINI, R.M.; ZHANG, C.Y.; TAN, B.K.H. Pharmacological activity of the interdomain segment between metalloproteinase and disintegrin domains. **Toxicon**, v. 35, p. 529-535, 1997.

KINI, R. M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiology Haemostasis andThrombosis**, v. 34, 200-204, 2005.

KRESS, L.F.; PAROSKI, E.A. Enzymatic inactivation of human serum proteinase inhibitors by snake venom proteinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**., v. 83, p. 649-656, 1978.

LAING, D.G; CLISSA, P.B; THEAKSTON, R.D.G; MOURA, DA.S; TAYLOR, M.J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloprotease-induced skin necrosis. **European Journal Immunology**, v.33, p 3458-3463, 2003.

LU, Q.M.; WEI, Q.; JIN, Y.; WEI, J.F.; WANG, W.Y.; XIONG, Y.L. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **Journal Natural Toxins**, v. 11, p. 345-352, 2002.

MACKESSY, S. P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K. G. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: A case of venom paedomorphosis? **Copeia**, p. 769-782, 2003.

MACKESSY, S. P., 2010. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**, 15p.

MANDLE, R.J.; COLMAN, R.W.; KAPLAN, A.P. Identification of pre-kallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v.73, p. 4179-4183, 1976.

MANNING, M.C. Sequence analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from *Agkistrodon contortrix contortrix*. **Toxicon**, v. 33, p. 1189-1200, 1995.

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

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

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochemica et Biophysica Acta: BBA** 1477, 146-156. 2000.

MATRISIAN L. M., The matrix degrading metalloproteinases. **BioEssay**, v. 14, p 455-463, 1992.

MORITA, T.; IWANAGA, S. Prothrombin activator from *Echis carinatus* venom. **Methods Enzymology**, v. 80, p. 303-311, 1981.

MOSESSON, M.W.; SIEBENLIST, K.R.; MEH, D.A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. **Annals of the New York Academy Sciences** , v. 936, p. 11-30, 2001.

MOURA-DA-SILVA, A.M., BUTERA, D., TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Current Pharmaceutical Design**, in press, 2007.

MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. N. Thrombomodulin-independent activation of protein C and specificity of hemostatically active snake venom serine proteinases: crystal

structures of native and inhibited *Agkistrodon contortrix contortrix* protein C activator. **Journal Biology Chemistry**, v. 280, p. 39309-39315, 2005.

NISHIDA, S.; FUJITA, T.; KOHNO, N.; ATODA, H.; MORITA, T.; TAKEYA, H.; KIDO, I.; PAINE, M.J.; KAWABATA, S.; IWANAGA, S. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of prothrombin activator (ecarin) in *Echis carinatus* venom. **Biochemistry**, v.34, p. 1771-1778, 1995.

NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; DE LA TORRE, P.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J. Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 57-78, 2009.

OWNBY, C.L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **Journal of Toxicology – Toxin Review.**, v. 17, p. 1003-1009, 1998.

OWNBY, C.L.; ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v.37, p 411-445, 1999.

PAGE, M. J.; Di CERA, E. Serine peptidases: classification, structure, and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

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

RASCHE, H. Haemostasis and thrombosis: an overview. **European Heart Journal Supplements**, 2001.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Snake venom metalloprotease-structure and function of catalytic and desintegrin domains. **Comparative biochemistry and Physiology, parte C** 142, p 328-346, 2006.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. D227-D233, 2010.

RODRIGUES, V.M., SOARES, A.M., GUERRA-SÁ, R., FONTES, M.R.M., GIGLIO, J.R. Structural and funcional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,. 381, 213-224, 2000.

SAKURAI, Y.; TAKATSUKA, H.; YOSHIOKA, A.; MATSUI, T.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJIMURA, Y. Inibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. **Toxicon**, v. 39, p.1827-1833, 2001.

SANCHEZ, E.F.; COSTA, M.I.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; ASSAKURA, M.T.; MANDELBAUM, F.R.; DINIZ, C.R. Characterization of a hemorrhagic factor, LHF-

I, isolated from the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom. **Toxicon**, v. 33, p. 1653-1667, 1995.

SANCHEZ, E.F.; SWENSON, S. Proteases from South American snake venoms affecting fibrinolysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 3, p. 147-157, 2007.

SAXENA, P.; THOMPSON, P.; d'UDENKEN, Y.; KONSTANTINOV, I.E. Kallikrein-Kinin System: A Surgical Perspective in Post-Aprotinin Era. **Journal of Surgical Research**, v. 167, p. 70-77, 2011.

SCHALOSKE, R.H; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochemica et Biophysica Acta: BBA**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

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

SILVA, V.X. Revisão sistemática do complexo e *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). v.1e 2. Tese (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SILVA, V.X. da, 2004. The *Bothrops neuwiedi* complex, p.410-422. In Campbell, J.A. & Lamar, W.W. (ed.). **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Comstock, Ithaca, London.

SILVA, V.X.; RODRIGUES, M.T. Taxonomic revisión of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, n.1, p. 45-90, 2008.

SOARES, A.M; FONTES, M.R.M; GIGLIO, J.R. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Current Organic Chemistry** v.8, p.1677-1690, 2004.

SOUZA J. R. F., MONTEIRO R. Q., CASTRO H. C., ZINGALI R. B., Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents, **Toxicon**, v. 39, p. 787-792, 2001.

STABELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternates* snake venom. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2881-2886, 2004.

STÖCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F.X.; MCKAY, D.B.; BODE, W. The metzincins – Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Science**, v. 4, p. 823-840, 1995.

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

STÖCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. **Current Opinion Structural Biology**, v.3, p.383-390, 1995.

TAKATSUKA, H.; SAKURAI, Y.; YOSHIOKA, A.; et al. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta: BBA**, v. 1544, p. 267-277, 2001.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta: BBA**, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.04.009.

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

VALENTE, R.H.; GUIMARÃES, P.R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A.G.C.; SOARES, M.R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M.R.O.; LÉON, I.R.; ROCHA, S.L.G.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; WERMELINGER, L.S.; DUTRA, D.L.S.; LEÃO, L.I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; HO, P.L.; ZINGALI, R.B.; PERALES, J.; DOMONT, G.B. *Bothrops insularis* venomomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 241-255, 2009.

WANG, W.J.; SHIH, C.H.; HUANG, T.F. Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochimie**, v.87, p. 1065-1077, 2005.

WARD, C.M.; ANDREWS, R.K.; SMITH, A.I.; BERNDT, M.C. Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand factor receptor glycoprotein Ibalph. Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of Ibalph as a binding site for von Willebrand factor and alpha-thrombin. **Biochemistry**, v. 35, p. 4929-4938, 1996.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 77-88, 2010.

WATANABE, L.; SHANNON, J.D.; VALENTE, R.H.; RUCAVADO, A.; ALAPE-GIRÓN, A.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein Science**, v.12, p. 2273-2281, 2003.

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

WIJEYEWICKREMA, L.C.; GARDINER, E.E.; MOROI, M.; BERNDT, M.C.; ANDREWS, R.K. Snake venom metalloproteinases, crotarhagin and alborhagin, induce ectodomain shedding of the platelet collagen receptor, glycoprotein VI. **Journal Thrombosis Haemostasis**, v. 98, p. 1285-1290, 2007.

WU, W.B.; PENG, H.C.; HUANG, T.F. Crotalin, a vWF and GP Ib cleaving metalloproteinase from venom of *Crotalus atrox*. **Journal Thrombosis Haemostasis**, v. 86, p. 1501-1511, 2001.

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

XU, X.L.; LIU, X.H.; WU, B.; LIU, Y.; LIU, W.Q.; XIE, Y.S.; LIU, L.Q. Metal-ion- and pH-induced conformational changes of acutolysin D from *Agkistrodon acutus* venom probed by fluorescent spectroscopy. **Biopolymers**, v. 74, p. 336-344, 2004.

YAMADA, D.; SEKIYA, F.; MORITA, T. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. **Journal Biology Chemistry**, v. 271, p. 5200-5207, 1996.

ZULIANI, J.P.; KAYANO, A.M.; ZAQUEO, K.D.; NETO, A.C.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; STABELI, R.G. Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. **Protein and Peptides Letters**, v. 16, p. 908-912, 2009.

Capítulo 2

Caracterização bioquímica, funcional e imunoquímica de uma nova metaloproteinase (BpMPI) isolada de peçonha de
Bothropoides pauloensis (Bothrops pauloensis)

Caracterização bioquímica, funcional e imunoquímica de uma nova metaloproteinase (BpMPI) isolada de peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)

Dayane L. N. de Souza ^{a,e} , Mário Sérgio R. Gomes ^{a,b,e} , Renata Santos Rodrigues ^{c,e} , Michael Richardson^d , Márcia Helena Borges^d , Veridiana M. Rodrigues ^{a, e *}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia(UFU), Uberlândia-MG, Brasil.

^b Departamento de Química e Exatas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié-BA, Brasil.

^c Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP - Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto – São Paulo, Brazil.

^d Fundação Ezequiel Dias, FUNED, Belo Horizonte – MG, Brasil

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

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

Resumo

No presente estudo, uma metaloproteinase denominada BpMPI foi isolada da peçonha da serpente *Bothropoides pauloensis* e suas características bioquímicas, enzimáticas e imunoquímicas foram determinadas. BpMPI foi purificada utilizando dois passos cromatográficos em resinas de troca iônica CM-Sepharose *Fast Flow* e Sephacryl S-300. Esta protease mostrou-se homogênea em SDS-PAGE apresentando uma única cadeia polipeptídica de 23 kDa sob condições redutoras. A estrutura primária da enzima mostrou alta similaridade com outras enzimas SVMPs de venenos de serpentes. BpMPI mostrou atividade proteolítica sobre azocaseína e fibrinogênio bovino e foi inibida por EDTA, 1,10 fenantrolina e β -mercaptoetanol. Além disso, esta enzima apresentou estabilidade em pH neutro ou alcalino e foi inativada em temperaturas elevadas. BpMPI também foi capaz de hidrolisar os substratos da calicreína glandular e tecidual, mas foi incapaz de hidrolisar os substratos do fator Xa e plasmina. A enzima não foi capaz de induzir hemorragia local na região dorsal de camundongos mesmo em altas doses. Estudos imunoquímicos demonstraram que os anticorpos anti-BpMP-I foram eficientes em neutralizar a atividade hemorrágica e as alterações sistêmicas induzidas pela peçonha de *Bothropoides pauloensis*.

Palavras-chave: *Bothropoides pauloensis*, metaloprotease, não hemorrágica, peçonha de serpentes, anticorpos.

Abstract

In the present study, a metalloproteinase named BpMPI was isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom and its biochemical, enzymatic and immunochemical characteristics were determined. BpMPI was purified in two chromatography steps on ion exchange resins CM-Sepharose Fast flow and Sephacryl S-300. This protease was homogeneous on SDS-PAGE and showed a single chain polypeptide of 23 kDa under reducing conditions. The primary structure of the enzyme showed high similarity with other SVMPs enzymes from snake venoms. BpMPI showed proteolytic activity upon azocasein and bovine fibrinogen and was inhibited by EDTA, 1,10 phenantroline and β -mercaptoethanol. Moreover, this enzyme showed stability at neutral and alkaline pH and it was inactivated at high temperatures. BpMPI was able to hydrolyse glandular and tecdial kallikrein substrates, but was unable to act upon factor Xa and plasmin substrates. The enzyme did not able to induce local hemorrhage in the dorsal region of mice even at high doses. Immunochemistry studies showed that BpMPI was high immunogenic and the antibodies anti-BpMP-I were very efficient to neutralize the hemorrhagic activity and systemic alterations induced by *Bothropoides pauloensis* snake venom.

Keywords: *Bothropoides pauloensis*, metalloproteinase, snake venom, antibodies.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente há aproximadamente 2.900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. Ocorrem no Brasil 10 famílias, 70 gêneros e 371 espécies correspondendo cerca de 10% do total de espécies conhecidas (BÉRNILS, 2010). As serpentes responsáveis pelos envenenamentos estão agrupadas nas famílias Viperidae e Elapidae. Na família Viperidae, responsável pela maioria dos acidentes, estão presentes os gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Caudisona*, *Rhinocerothis* e *Lachesis* (FENWICK et al., 2009; HOSE, 2009) .

O gênero *Bothrops* passou por uma reclassificação (FENWICK et al., 2009) baseada em aspectos morfológicos e moleculares, como análise do DNA mitocondrial. Nesta reclassificação algumas serpentes antes botrópicas passaram a fazer parte de um novo gênero, *Bothropoides*. A espécie atualmente denominada *Bothropoides pauloensis* foi descrita inicialmente como *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Amaral, 1925), uma das doze subespécies do complexo *Bothrops neuwiedi*. No ano de 2000 após uma revisão sistemática, as 12 subespécies foram elevadas a sete espécies distintas, dentre elas a espécie *Bothrops pauloensis* (SILVA, 2000). Essa classificação foi aceita em 2005 pela Sociedade Brasileira de Herpetologia-SBH e hoje após a última revisão *Bothrops pauloensis* se tornou *Bothropoides pauloensis* (SILVA; RODRIGUES, 2008; FENWICK et. al. 2009).

As peçonhas botrópicas e botropóicas apresentam vários compostos biologicamente ativos, como metaloproteinases, serinoproteinases, fosfolipases A₂, entre outros componentes enzimáticos e não enzimáticos, que podem levar a uma resposta inflamatória, necrose tecidual, além de causar alterações no

sistema hemostático (OLIVEIRA et al., 1999; RUCAVADO et al, 2002; TEIXEIRA et al., 2005; CRUZ et al, 2009). Em sua maioria, podem levar a ativação de fatores da coagulação e da protrombina, que posteriormente resultará em um quadro de hipofibrinogenemia, elevando o risco de sangramentos, que pode acarretar choque hipovolêmico e aumento da morbidade ou mesmo a mortalidade das vítimas (WHITE, 2005).

As metaloproteinases (SVMPs) são os componentes mais abundantes presentes em peçonhas de serpentes Viperídeas, representando aproximadamente 32% dos compostos protéicos (FOX; SERRANO, 2008). Essas proteases interferem no equilíbrio do sistema hemostático, além de degradar componentes da matriz extracelular e da membrana basal (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MATSUI et al., 2000; LAING et al., 2003; GUTIERREZ et al., 2005; FOX; SERRANO, 2008). A maioria das (SVMPs) são fibrin(ogen)olíticas e clivam preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio. Por apresentarem essa atividade as metaloproteinases têm grande aplicabilidade médica, podendo ser utilizadas como agentes desfibrinogenantes e na dissolução de trombos (MATSUI et al., 2000).

As SVMPs apresentam grande diversidade estrutural e funcional (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000). São classificadas de acordo com a presença ou ausência de seus múltiplos domínios estruturais. Fox e Serrano (2008) propuseram uma classificação para as SVMPs, baseando-se em análises proteômicas e transcriptômicas. De acordo com essa classificação, a classe P-I representa as SVMPs que possuem apenas o domínio metaloproteinase; PIIa a PIIe (possuem o domínio metaloproteinase e domínios desintegrina; podem estar presentes como dímeros ou somente como dímeros de desintegrina). PIIIa a

PIIIc (contêm o domínio metaloproteinase, desintegrina-like e domínio rico em cisteínas, podem também formar dímeros) e finalmente PIIId, anteriormente denominada de PIV (BJARNASON; FOX, 1994) (contêm a estrutura de PIII e 2 domínios lectina tipo-C conectados por ligações dissulfeto).

As SVMPs são importantes também na indução dos danos teciduais locais após o envenenamento. Estes se caracterizam por hemorragia, edema e mionecrose, os quais resultam em uma das mais comuns e sérias consequências de envenenamentos por serpentes botrópicas e botropóicas (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MATSUI et al., 2000; LAING et al., 2003; GUTIERREZ et al., 2005; KANG et al, 2011)

A inoculação da peçonha em acidentes ofídicos ocorre através da mordedura da serpente. Para que as alterações locais e sistêmicas ocorram é necessário que as toxinas presentes nas peçonhas cheguem aos tecidos e à circulação sistêmica. As metaloproteinases podem estar envolvidas neste processo de espalhamento da peçonha inoculada. Sendo, portanto responsáveis pela indução dos efeitos sistêmicos (ex: coagulopatia, hipotensão) e danos teciduais locais tais como (edema, inflamação, hemorragia e necrose) (ANAI et al., 2002).

O único tratamento aceito para os acidentes ofídicos é a soroterapia, embora existam vários estudos buscando alternativas de tratamentos. O soro antiofídico é a mistura de imunoglobulinas ou anticorpos resultantes da sensibilização de animais (geralmente cavalos) por aplicações sucessivas de doses da peçonha bruta (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001). O tratamento pode envolver reações adversas, pois o soro aplicado contra a peçonha é proveniente de um organismo diferente ao homem e esse por sua vez o reconhece como um corpo estranho. A utilização de antisoros enriquecidos com anticorpos anti-

metaloproteinases poderia ser um método alternativo para melhorar a eficiência do tratamento antiofídico, além de reduzir a quantidade de soro no paciente diminuindo a probabilidade de choque anafilático (SRIPRAPAT et al., 2003).

O presente trabalho teve como objetivo isolar, avaliar os aspectos estruturais, funcionais e imunoquímicos de uma metaloproteinase isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*B. pauloensis*), denominada BpMP-I.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Peçonha e animais

A peçonha da serpente *B. pauloensis* (Bp) foi obtida a partir de espécimes mantidas no serpentário Bioagents, Batatais – São Paulo, Brasil. Após as coletas, a peçonha foi liofilizada e conservada a -20°C.

Os camundongos machos Swiss e camundongos isogênicos da linhagem BALB/c foram mantidos em condições padrão de luz (ciclo de 12h luz/12h escuro em temperatura ambiente) no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com água e suplemento alimentar “*ad libitum*”. Os cuidados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA, Protocolo nº 063/08 e nº 046/09) da Universidade Federal de Uberlândia e estavam de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/ Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (COBEA/SBCAL).

2.2. Reagentes para eletroforese, cromatografia, seqüenciamento, ensaios enzimáticos e biológicos

Colunas cromatográficas CM-Sepharose, Sephacryl S300 e Proteína A Sepharose foram obtidas da Amersham Biosciences do Brasil. Acrilamida, bis-acrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino(TEMED), dodecilsulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, fibrinogênio bovino, trombina humana, azul de bromofenol, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), aprotinina, benzamidina, 1,10-fenantrolina, soroalbumina bovina (BSA) obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Os substratos cromogênicos: S 2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNa), S 2222 (N-Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNa), S 2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA), S 2266 (H-D-Val-Leu-Arg-pNa) e S 2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA) foram adquiridos do laboratório Chromogenix (Itália). Os demais reagentes eram de grau analítico.

2.3. Isolamento da metaloproteinase BpMPI

2.3.1. Cromatografia CM-sepharose *Fast Flow*

A peçonha de *B. pauloensis* (200mg) foi ressuspensa em 2mL do tampão de bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M , pH 7,8. Posteriormente, centrifugada à 100xg por 10 min, à 4° C e o sobrenadante límpido retirado (115mg) e aplicado em uma coluna contendo resina CM-sepharose *Fast Flow*, previamente equilibrada no mesmo tampão.

A amostra foi eluída por um gradiente convexo de concentração usando o tampão bicarbonato de amônio 0,05M a 0,5M (pH 7,8), em temperatura ambiente. As frações foram coletadas em 1mL/tubo em fluxo de 6,5mL/h por um coletor de frações Redifrac (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). As frações foram monitoradas através do espectrofotômetro Ultrospec 1000 – Amersham

Pharmacia Biotech, absorvância a 280nm. O cromatograma foi traçado e as amostras de proteínas foram separadas, liofilizadas e armazenadas à -20°C.

2.3.2. Cromatografia em gel de filtração Sephacryl S300

A fração CM3 (8mg) foi ressuspensa e aplicada em uma coluna HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR previamente equilibrada com tampão de bicarbonato de amônio 0,05M pH 7.8. A amostra foi eluida no mesmo tampão com um fluxo de 0,2mL/min pré-programado no sistema Akta prime plus (Amersham Biosciences) e frações 2mL por tubo foram então coletados. Amostras foram liofilizadas e mantidas à -20°C.

2.3.3. Cromatografia de alta eficiência em modo fase reversa (HPLC-RP)

A fração principal proveniente da Sephacryl S300 (BpMP-I) foi diluída em 500µL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) e submetida no sistema de HPLC-RP, coluna C4 Vydac 214TP54 (25cm x 4,6mm D.I.). A eluição da amostra foi inicialmente realizada em ácido trifluoracético 0,1% (v/v), seguindo com gradiente de concentração linear de acetonitrila 80% em um fluxo de 1mL/min a temperatura ambiente. O pico principal foi separado e liofilizado para determinação das propriedades químicas e estruturais.

2.4. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Nesse método, uma alíquota de cada amostra foi dissolvida para 100µL com água deionizada e adicionados 3mL do reagente de Bradford (100mg de Coomassie Blue G, 50mL de etanol 100%, 100mL de ácido fosfórico

85% e água deionizada suficiente para completar 1 litro de solução). As determinações foram feitas em triplicatas e a absorbância medida a 595nm. Paralelamente à dosagem de proteínas foi construída uma curva padrão de soroalbumina bovina (1mg/mL), considerando o coeficiente de extinção molar em 280nm (0,665). A concentração de proteínas em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

2.5. Caracterização bioquímica

2.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes e determinação do peso molecular

A eletroforese com agente desnaturante Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu de: gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% e gel de separação a 12,5% contendo Tris-HCl 2,0M pH 8,8 e SDS 0,1%, mantendo a relação de Bis:Acrilamida 0,8:30. Todos os géis foram preparados num sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical. Amostra contendo 10 μg da proteínas foi dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625M pH 6,8; Glicerol a 10%; β -mercaptoetanol 5% ; 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol (condição redutora) e outra amostra contendo mesma concentração foi diluída no mesmo tampão e na ausência do β -mercaptoetanol (condição não redutora). As soluções foram aquecidas a 100°C por 4 minutos em banho-maria e aplicadas em gel de eletroforese. Os padrões de massa molecular utilizados foram: Albumina Bovina 66 kDa; Ovoalbumina 45 kDa;

Anidrase carbônica 29 kDa; Tripsinogênio 24 kDa; β -lactoglobulina 18 kDa; α -lactoalbumina 14 kDa.

O tampão do eletrodo continha Tris-HCl 0,025M, Glicina 0,19M e SDS 0,1%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada em corrente de 20mA até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel. O gel foi corado em solução de coomassie blue- R250 0,1% em água, ácido acético 10% e metanol 50% e descorado em solução de ácido acético a 7% e etanol 30% para posterior análise.

A mobilidade eletroforética relativa de cada banda foi determinada em centímetros e a massa molecular foi calculada, relacionando o logaritmo do peso molecular do padrão com a mobilidade eletroforética relativa.

2.5.2. Determinação da sequência

A metaloproteinase (1mg) foi reduzida e alquilada com 4-vinil piridina, como descrito por Wilson e Yuan (1989). BpMP-I foi diluída em 1mL de 0,1M Tris-HCl (pH 8) e 6M Guanidina-HCl. Depois da adição de 30 μ L de β -mercaptoetanol, a amostra foi primeiramente incubada a 50°C por 4h, e com 40 μ L de 4-vinil piridina a 37°C por 2 horas no escuro. Posteriormente, a amostra foi dessalinizada em uma coluna P10 (GE, healthcare). As proteínas S-piridil-etilada foram clivadas por tripsina (2% m/m, enzima:substrato em 1mL de 0,1M de bicarbonato de amônio, pH 7,9) por 4,5h a 37°C. Os produtos de clivagem foram separadas por uma coluna Vydac C18 (4,6 x 250mm) usando um gradiente linear de 0 a 50% de acetonitrila em solução de 0,1% TFA e a sequência determinada utilizando o seqüenciador de proteínas Shimadzu PPSQ-21A. A estrutura primaria da BpMP-I foi comparada com outras sequências do banco de dados relatadas no SWISS-PROT/TREMBL usando os programas FASTA3 e o BLAST.

2.6. Caracterização Enzimática

2.6.1. Atividade Azocaseinolítica

A atividade proteolítica sobre a azocaseína foi realizada segundo Gomes e colaboradores (2011), com modificações. A solução de azocaseína (1mg/mL) foi preparada com tampão Tris 0,05M e NaCl 0,15M com pH 7,8, acertado com HCl. Em seguida, essa solução foi colocada em uma placa de 96 poços (NUNC MaxiSorp) (160µL/poço) e para iniciar a reação foi adicionada 45µL de tampão fosfato de sódio (PBS) contendo diferentes quantidade da toxina purificada (0,5µg, 1µg, 2µ, 5µg, 10µg e 20µg). Após 30 minutos de incubação a 37°C, foi adicionado 45µL da solução de ácido tricloroacético 20% (m/v). A placa foi deixada por 30 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 1856 xg por 20min, o sobrenadante foi transferido e a absorbância foi determinada a 405nm na leitora EL800-Biotek. Uma unidade (U) de atividade azocaseinolítica é definida como sendo o acréscimo de 0,01 unidades de absorbância a 405nm em relação as condições do ensaio controle. Os ensaios foram realizados em triplicatas. O resultados foram plotados em gráfico.

O efeito do pH na atividade proteolítica da BpMP-I (10µg) foi determinada preparando-se previamente a enzima em diferentes soluções tampões de pHs (pH 3, 50 mM tampão glicina-HCl; pH 5, 50 mM tampão acetato; pHs 7,5; 8; 8.75 e 10,0 , 50 mM tampão Tris-HCl; pH 11,50 mM tampão glicina-NaOH) e incubando por 1h a 37°C. Posteriormente, a estas soluções foram adicionadas 160µL de azocaseína a 1mg/mL. Os ensaios foram conduzidos conforme descrito acima.

A estabilidade térmica da BpMP-I (10µg) também foi ensaiada, pré-incubando soluções da enzima a diferentes temperaturas (4°C a 100°C) por 1h

em pH 7,4, e posteriormente, a atividade azocaseinolítica foi determinada em pH 7,8 a 37°C.

2.6.2. Atividade Fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica foi realizada segundo Rodrigues et al (2000), com modificações. Em 50µL de solução de fibrinogênio bovino (1mg/ml em PBS pH 7,8) foram incubados diferentes concentrações da enzima (0,5µg ; 1µg; 2µg; 5µg; 10µg; 20µg) por 1h a 37°C. A reação foi parada com a adição de 25µL de solução contendo Tris-HCl 0,06M pH 6,8, 2% (m/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 10% (v/v) β-mercaptoenol e 0,05% (m/v) azul de bromofenol. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C por 4 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% com SDS (PAGE-SDS), como descrito no item 2.5.1.

O mesmo procedimento foi utilizado incubando a 5µg da metaloprotease em diferentes intervalos de tempo (0h, 5min, 10min, 15min, 30min, 1h, 2h) a 37°C, e também foram submetidas à eletroforese de gel do poliacrilamida.

O efeito de inibidores de proteases e agentes redutores quelantes sobre a atividade fibrinogenolítica foi examinado. A enzima (5µg) foi pré-incubado com 10µL de β-mercaptoetanol (10mM), EDTA(10mM), 1,10- fenantrolina (10mM), benzamidina (10mM), aprotinina (10mM) por 1h à 37°C. Posteriormente, foram adicionadas as amostras 50µL de fibrinogênio bovino (1mg/mL em PBS pH 7,8). Os produtos da reação foram analisados em PAGE-SDS 12,5%.

2.6.3. Atividade coagulante sobre o plasma bovino e o fibrinogênio

A atividade coagulante das amostras foi realizada segundo Assakura e colaboradores (1992), com algumas modificações. Para essa reação foram utilizados 150µL de plasma bovino citratado ou uma solução de fibrinogênio (1mg/mL em PBS pH 7,8) incubados com diferentes quantidade de enzimas (até 20µg) em 50µL de PBS pH 7,8. Os ensaios de coagulação foram realizadas em um analisador de coagulação micro-processador Quick-Timer (DRAKE LTDA). O modelo Quick-Timer determina o tempo de coagulação de uma amostra de plasma bovino utilizando um sistema óptico que detecta a variação da densidade ótica da amostra no instante da coagulação.

2.6.4. Atividade sobre a fibrina

A atividade fibrinolítica da BpMP-I foi realizada segundo a metodologia descrita por Gomes e colaboradores (2011). Primeiramente foram adicionadas 5NIH unidades/mL de trombina humana em 500µL de fibrinogênio bovino (2,5mg/mL 0,2M Tris-HCl 0,02M CaCl₂ pH 8) em temperatura ambiente. Depois a mistura foi homogeneizada, e alíquotas contendo 100µL/tubo da solução foram colocados para polimerizar durante 2h à temperatura ambiente. Após a formação do coagulo de fibrina, foram adicionadas 20µL (10µg) da BpMP-I e incubadas em diferentes intervalos de tempo (30', 45', 60', 120' e 180') a 37°C. Para interromper a reação foram adicionadas 60µL solução contendo Tris-HCl 0,06M pH 6,8, 2% (m/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 10% (v/v) β-mercaptoenol e 0,05% (m/v) azul de bromofenol, o produto foi então analisado em PAGE-SDS, como descrito no item 2.5.1.

2.6.5. Atividade sobre os substratos cromogênicos

A atividade amidolítica da enzima foi determinada pelo método descrito por Rodriguez-Acosta e colaboradores (2010), com algumas modificações. Em placa de 96 poços, 150µL dos substratos **S-2238** (substrato para *thrombin-like*); **S-2266** (substrato para calicreína glandular); **S-2222** (substrato para fator Xa); **S-2351** (substrato para plasmina); **S-2302** (substrato para calicreína plasmática), diluídos de acordo com as especificações do fabricante, foram adicionados a 50µL de solução (TRIS/HCl 0,05M, CaCl₂ 0,005M pH 7.4) e incubados a 37°C por 20min e 50min. A absorbância a 405nm foi mensurada em leitora de microplacas (*BioTeK – Elx50*). Uma unidade de atividade amidolítica foi considerada a quantidade de enzima a qual produz um aumento na absorbância de 0,01 unidade a 405 nm.

2.6.6. Atividade Hemorrágica

O ensaio de atividade hemorrágica foi realizado segundo método descrito por Nikai e colaboradores (1984). A hemorragia foi induzida por injeções intradérmicas (i.d.) de diferentes doses da peçonha de *B. pauloensis* e da enzima *BpMPI* (10µg e 50µg, respectivamente) no dorso de camundongos Swiss machos (18-22g, n=4). Após três horas, os animais foram anestesiados com soluções de ketamina® 10% (0,05ml/kg) + xilasina® 2% (0,025ml/kg) e posteriormente sacrificados. As peles foram removidas e a área hemorrágica foi medida utilizando-se um paquímetro de baixa pressão (CALIPER).

2.7. Ensaios Imunoquímica

2.7.1. Produção e purificação de anticorpos policlonais anti- BpMP-I e anti-peçonha bruta (anti-Bp)

A indução da síntese de anticorpos policlonais foi realizada em camundongos da linhagem Balb/c (n=5), por meio de 4 imunizações com intervalos de 2 semanas. A primeira inoculação foi feita com adjuvante de Freund's completo e os reforços com adjuvante de Freund's incompleto (razão 1:1 v/v, solução imunogênica/adjuvante). Foram utilizados 50µg/injeção de BpMP-I ou 10µg/injeção de peçonha de *B. pauloensis* em um volume final de 0,1mL/camundongo. As aplicações foram realizadas intraperitonealmente. Os animais foram sangrados após sete dias da última inoculação e o soro mantido a -20°C até a titulação. Para a obtenção das imunoglobulinas G(IgGs) puras foi realizado o fracionamento do soro utilizando a resina Proteína A Sepharose. Inicialmente a resina foi equilibrada com Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,15M, pH 7,5 permitindo a interação específica das IgGs presentes no soro. Estas foram eluídas posteriormente utilizando-se glicina-HCl 0,1M, pH 3,0. As frações contendo as IgGs foram monitoradas por espectrofotometria a 280nm. As frações foram neutralizadas com álcali (Tris 1M) para a proteção do estado nativo destas imunoglobulinas. Em seguida as amostras foram congeladas, liofilizadas e armazenadas a -20°C (WALKER, 1996).

A reatividade específica contra a BpMP-I e contra a peçonhas bruta, bem como a titulação das imunoglobulinas G obtidas das amostras de soro dos camundongos imunizados entre os dias 0 e 42, foram determinadas pelo teste de ELISA, usando microplaca de alta afinidade com de 96 poços (Nunc Maxisorp F8, Life Technologies Limited, Paisley, UK) sensibilizada com 100µL de antígeno

(BpMP-I ou peçonha bruta na concentração 10µg/mL em 0,06M NaHCO₃, pH 9.6). A placa foi incubada *overnight* a 4°C, então lavada três vezes com PBS-T e bloqueada com 1% (m/v) de BSA em PBS-T por 1 h a 37 °C.

Para verificar a titulação das amostras dos soros (dia 49) foram feitas as seguintes diluições: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 e 1:12800, que em seguida foram adicionadas a poços de uma placa de microtitulação (100µL/poço) em duplicatas e incubadas 2 h a 37°C. A placa foi lavada seis vezes com PBS-T, então incubada por 1h a 37°C com 100µL/poço de Anti-Mouse IgG(Fab Specific) conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, UK, diluídos 1:5000). A revelação foi realizada em solução cromogênica ortofenileno-diamina (OPD) a 1mg/mL, diluída em tampão substrato (0,1M ácido cítrico, 0,1M acetato de sódio, pH 5,4, contendo 0.1% H₂O₂) sendo 50uL, por 10 minutos. A reação foi interrompida com 25µl de H₂SO₄ a 0,1M e a absorbância a 492 nm foi registrada usando um leitor automático de ELISA (Dynex Technologies, UK). A taxa da densidade óptica da reação com soro imune foi determinada para os grupos de camundongos, assim como a reatividade cruzada entre o anticorpo produzido e as diferentes peçonhas testada (*B. pauloensis*, Bp; *B. jararaca*, Bj; *B. leucurus*, Bl; *B. moojeni*, Bmoo; *B. alternatus*, Balt).

2.7.2. Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha

***B. pauloensis* pelos anticorpos anti-Bp e anti BpMP-I**

Esta técnica foi realizada de acordo com o item **2.6.6**. Foi utilizada 8µg da peçonha de *B. pauloensis* para produzir um halo hemorrágico. Os ensaios de neutralização foram realizados utilizando a peçonha bruta de *B. pauloensis* incubada com os anticorpos anti-BpMP-I ou com anti-Bp nas razões 1:10, 1:20 e

1:50 (m/m, antígeno/anticorpo) e os grupos controles receberam apenas a peçonha ou salina. Todas as amostras foram previamente incubadas por 30min. a 37°C.

2.7.3. Neutralização dos distúrbios de coagulação

Para a determinação dos parâmetros de coagulação sanguínea, foram realizadas inoculações de 10µg da peçonha bruta de *B. pauloensis* por via intraperitoneal em camundongos Swiss machos de 18-22g (n=3). Os ensaios de neutralização foram realizados utilizando-se amostras contendo peçonha bruta incubada por uma hora a 37°C com anticorpos policlonais anti-BpMPI, na razão 1:50 (m/m). Animais inoculados com salina foram utilizados como controle. Após 3 horas da inoculação os camundongos foram anestesiados com soluções de ketamina® 10% (0,05ml/kg) + xilasina® 2% (0,025ml/kg) e sangrados por punção cardíaca. O sangue foi coletado na presença de citrato de sódio (50µ L/mL) e centrifugado a 600 xg por 15 minutos a 4°C (Centrifuge 5402-Eppendorf) e o plasma obtido foi utilizado para determinar o tempo de protrombina, tromboplastina parcial ativada e concentração plasmática de fibrinogênio de acordo com as recomendações do fabricante do Kit do Laboratório Wiener, Argentina. O tempo de coagulação foi determinado em um coagulômetro (Quick-Tmer- DRAKE Ltda).

2.8. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados com desvio padrão médio. Para a determinação da significância entre as médias, fez-se análise de variância (ANOVA) e o teste t, com significância de $p < 0,05$ usando o programa Prisma.

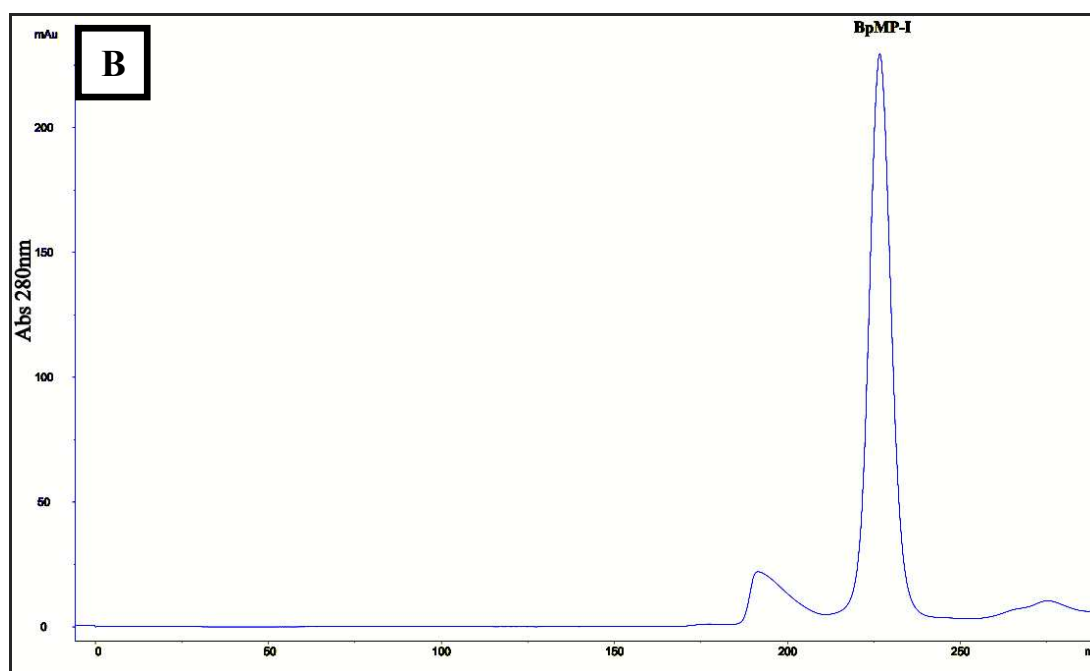
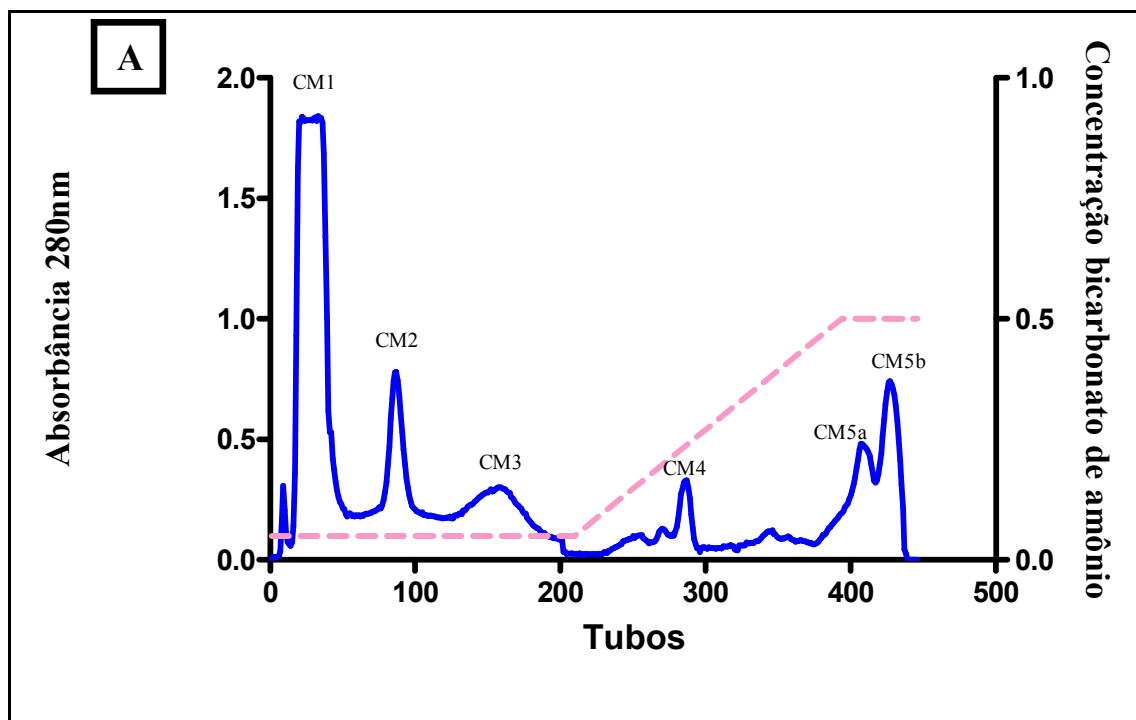
3. RESULTADOS

3.1. Isolamento e caracterização bioquímica da metaloproteinase BpMP-I da peçonha de *B. pauloensis*

O fracionamento da peçonha bruta de *B. pauloensis* em coluna cromatográfica de troca-iônica CM-Sepharose *Fast Flow* resultou em 6 frações denominadas CM1-CM2, CM3, CM4, CM5a e CM5b (**Figura 1A**) as quais foram reunidas em *pools*, liofilizadas e armazenadas a -20° C.

A amostra denominada CM3, apresentou atividades fibrinogenolítica (resultados não apresentados) e azocaseinolítica (**Tabela I**). Em análise por PAGE-SDS 13,5%, a mesma apresentou uma banda majoritária com um bom grau de pureza em relação às outras frações (resultados não apresentados).

A fração CM3 quando submetida a um fracionamento em gel de filtração Sephacryl S300 resultou em dois picos de absorbância a 280 nm. O pico principal (**Figura 1B**) foi então liofilizado e a amostra visualizada em PAGE-SDS a 13,5% em condições redutoras e não redutoras (**Figura 1D**) apresentando um único componente com massa molecular estimada de 23kDa e 20kDa, respectivamente. Esta proteína, denominada de BpMPI representou 2,26% da peçonha total e atividade proteolítica sobre a azocaseína (**Tabela I**). Esta proteína, denominada BpMP-I, foi posteriormente aplicada em uma coluna de fase reversa (C4/RP-HPCL) (**Figura 1C**) para a determinação de sua estrutura primária por meio de seu seqüenciamento utilizando o método de degradação de Edman.



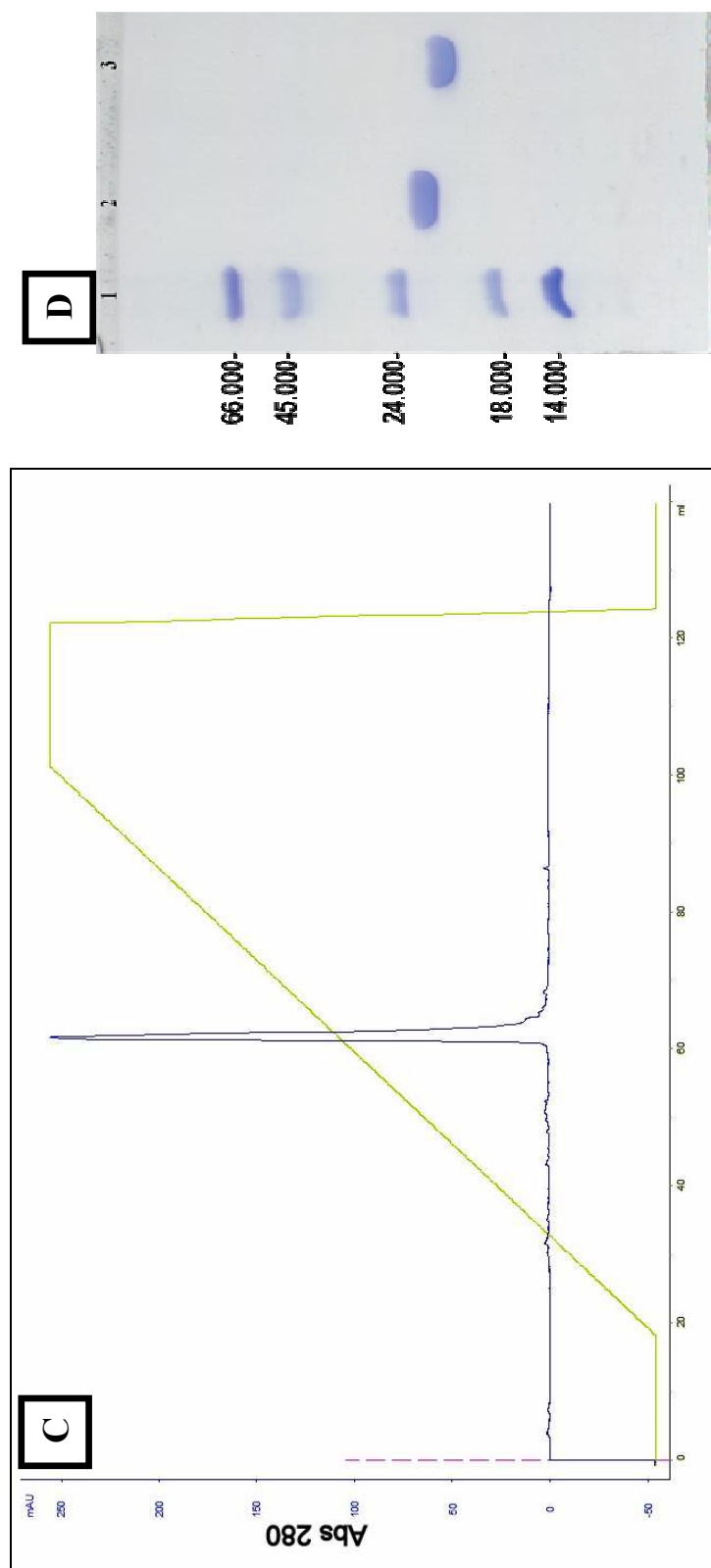


Figura 1. Passos sequencias para purificação da BpMP-I. (A) Cromatografia da peçonha bruta de *B. pauloensis* (110mg) na coluna de CM- Sepharose equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,8. O gradiente convexo foi aplicado utilizando tampão bicarbonato 0,5M pH 7,8. Frações de 1mL/tubo foram coletadas utilizando um fluxo de 6,5mL/h. (B) Fracção CM3 (8 mg) recromatografada em Sephacryl S-300 previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,8 com um fluxo de 0,2mL/min, usando o aparelho AKTA prime plus (Amersham Biosciences). (C) HPLC-RP em coluna coluna C4 Vydac 214TP54 (25cm x 4,6mm D.I.) de 1mg da BpMPI dissolvido em 550µL de ácido trifluoracético 0,1% (v/v). O pico foi eluído com fluxo de 1mL/min e absorbância monitorado a 280nm. (D) SDS-PAGE (13,5%) da BpMP-I purificada. 1: Marcador de Massa Molecular (Mr); 2: BpMP-I reduzida; 3: BpMP-I não reduzida.

Tabela I: Rendimento protéico e atividade enzimática da BpMP-I

Etapas de Purificação	mg (totais)*	Recuperação (%)	Atividade Azocaseinolítica (U/mg)[£]
Peçonha Bruta	115	100	1800
CM- 3	8	6,9	1460
BpMPI	2,6	2,26	1180

* Dosagem realizada pelo método de Bradford (1974).

£ 1U representa o aumento na variação de 0,01 de absorbância (405nm) que a enzima hidrolisa o substrato (azocaseína).

3.2. Seqüenciamento parcial da BpMP-I

O seqüenciamento parcial da BpMPI e o alinhamento com outras metaloproteinases de peçonhas de serpentes está apresentado na **Figura 2**. Verificou-se que a sequência da BpMP-I apresenta maior similaridade estrutural com a sequência da MP-1b, de *B.neuwiedi*, e também com outras metaloproteases da classe PI. A similaridade entre MP-1b e BpMP-I provavelmente está relacionada com o ancestral comum presente entre as serpentes do complexo neuwiedi.

A BpMPI apresenta duas sequências consenso que ocorrem nessa classe de enzimas (H₁₇₀E₁₇₁XXH₁₇₄XXG₁₇₇XXH₁₈₀ e A₁₂₃Q₁₂₄L₁₂₅L₁₂₆T₁₂₇), bem como resíduos de cisteínas conservados (145,185, 187,192, 209, 225) os quais podem estar envolvidos na formação de pontes dissulfeto.

3.3. Caracterização enzimática e biológica

A atividade azocaseinolítica da BpMP-I foi dose-dependente (**Figura 3A**). A partir desse resultado utilizou-se 10ug de BpMP-I para verificar a estabilidade da protease em diferentes pHs e sua termolabilidade. A BpMP-I apresentou ótima atividade em pH neutro e básico (**Figura 3B**) e perdeu totalmente sua atividade nas temperaturas de 60°C e 100°C (**Figura 3C**).

A metaloproteinase BpMP-I apresentou atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino (**Figura 4**), porém não foi capaz de degradar a fibrina, coagular o plasma bovino e a solução de fibrinogênio (resultados não apresentados). Os resultados de atividade fibrinogenolítica demonstram que 5ug de protease foram suficientes para degradar as cadeias A α e B β do fibrinogênio (**Figura 4A**). A hidrólise total da cadeia A α ocorreu com apenas 5 min de incubação da protease com o fibrinogênio. Em 1h as cadeias A α e B β foram totalmente degradadas (**Figura 4B**). Os ensaios de inibição da atividade fibrinogenolítica induzida pela BpMP-I, revelaram que esta foi completamente inibida quando previamente incubada com β -mercaptoetanol, EDTA e 1,10-fenantrolina (**Figura 4C**).

BpMP-I catalisou a hidrólise dose dependente dos substratos cromogênicos S-2302 (substrato para calicreína plasmática, H-D-Pro-Phe-Arg-pNA), S-2266 (substrato para calicreína glandular, H-D-Val-Leu-Arg-pNa) e S2238 (substrato para *thrombin-like*, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA). E não atuou sobre os substratos S-2222 (substrato para fator Xa, N-Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNa) e o S-2251 (substrato para plasmina, H-D-Val-Leu-Lys-pNa) (**Figuras 5**).

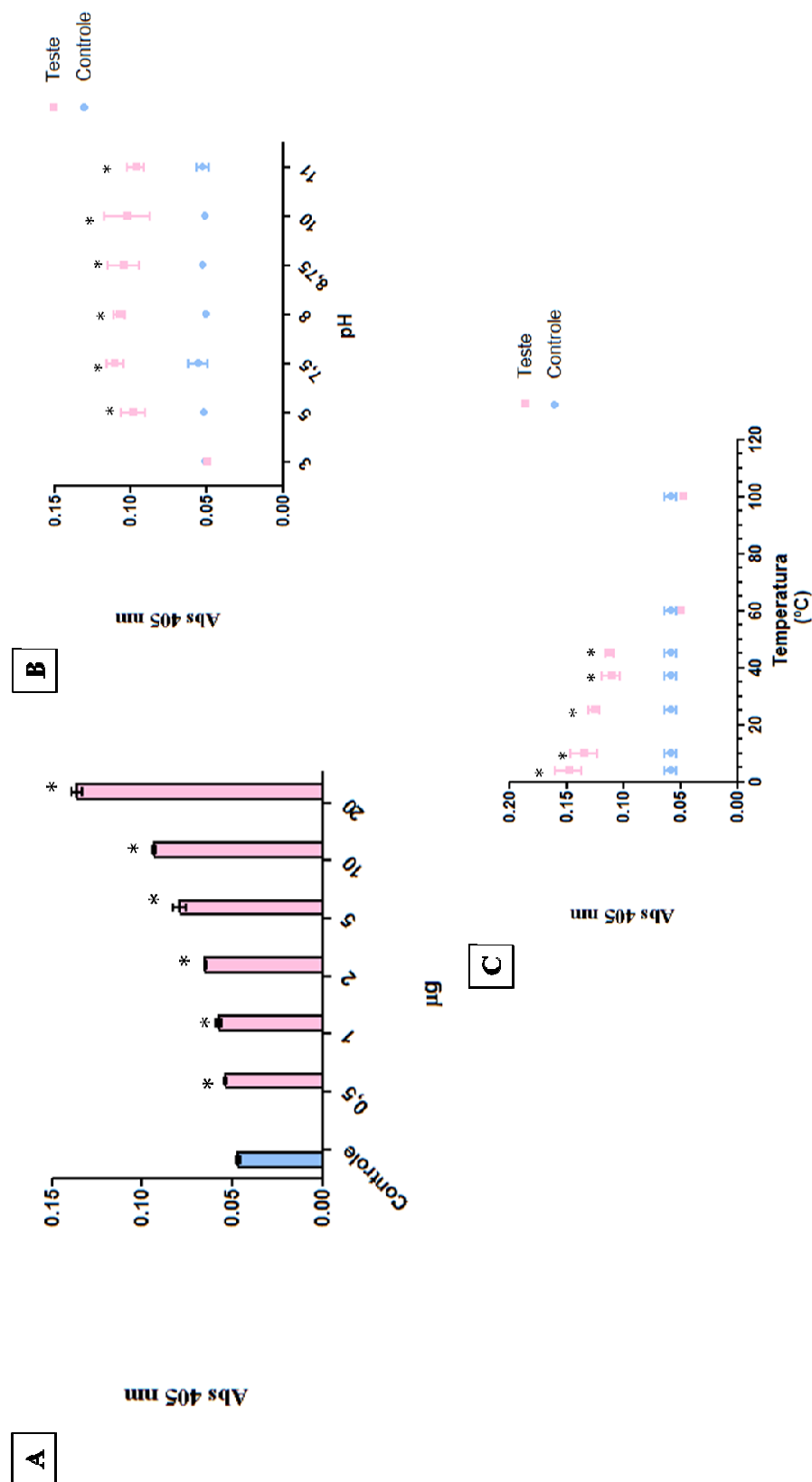


Figura 3. Determinação da atividade proteolítica da BpMP-I sobre a azocaseína (1mg/mL). (A) Dose dependente: diferentes concentrações de enzima foram incubadas com 160µL de solução de azocaseína e incubadas por 30min a 37°C, a reação foi parada com a adição de 45µL de solução de ácido tricloroacético 20% (m/v), absorvância mensurada a 405nm. (B) Variação do pH: 10µg de protease foram pré incubados com tampões em diferentes pHs (3;5;7;5; 8; 8,75; 10; 11), por 1h a 37°C, posteriormente a atividade azocaseinolítica determinada. (C) Estabilidade térmica: 10µg de BpMP-I foram preincubados em diferentes temperaturas (4°C; 10°C; 25°C; 37°C; 45°C; 60°C; 100°C) e a atividade azocaseinolítica determinada.

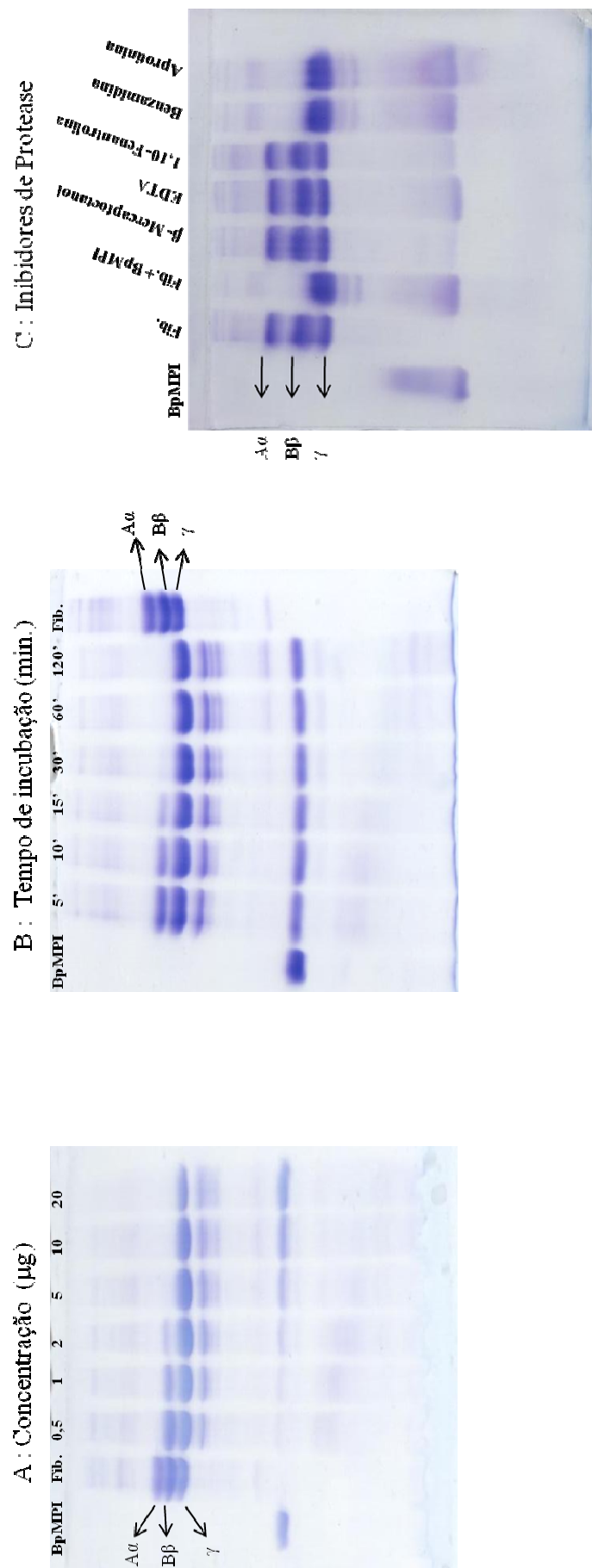


Figura 4. Atividade fibrinogenolítica da BpMPI-I avaliada em PAGE-SDS 13,5%, em diferentes condições experimentais. (A) Dose dependente: diferentes concentrações da enzima incubadas com 50µL de fibrinogênio bovino (1mg/mL) a 37°C por 1h. (B) Tempo dependente: 5µg de BpMPI-I incubados com 50µL de fibrinogênio bovino (1mg/mL) a 37°C. (C) Presença de inibidores de protease: 5µg BpMPI-I foram pré incubados com diferentes inibidores por 1h a 37°C, posteriormente foram adicionados 50µL de fibrinogênio bovino e incubados por 1h a 37°C.

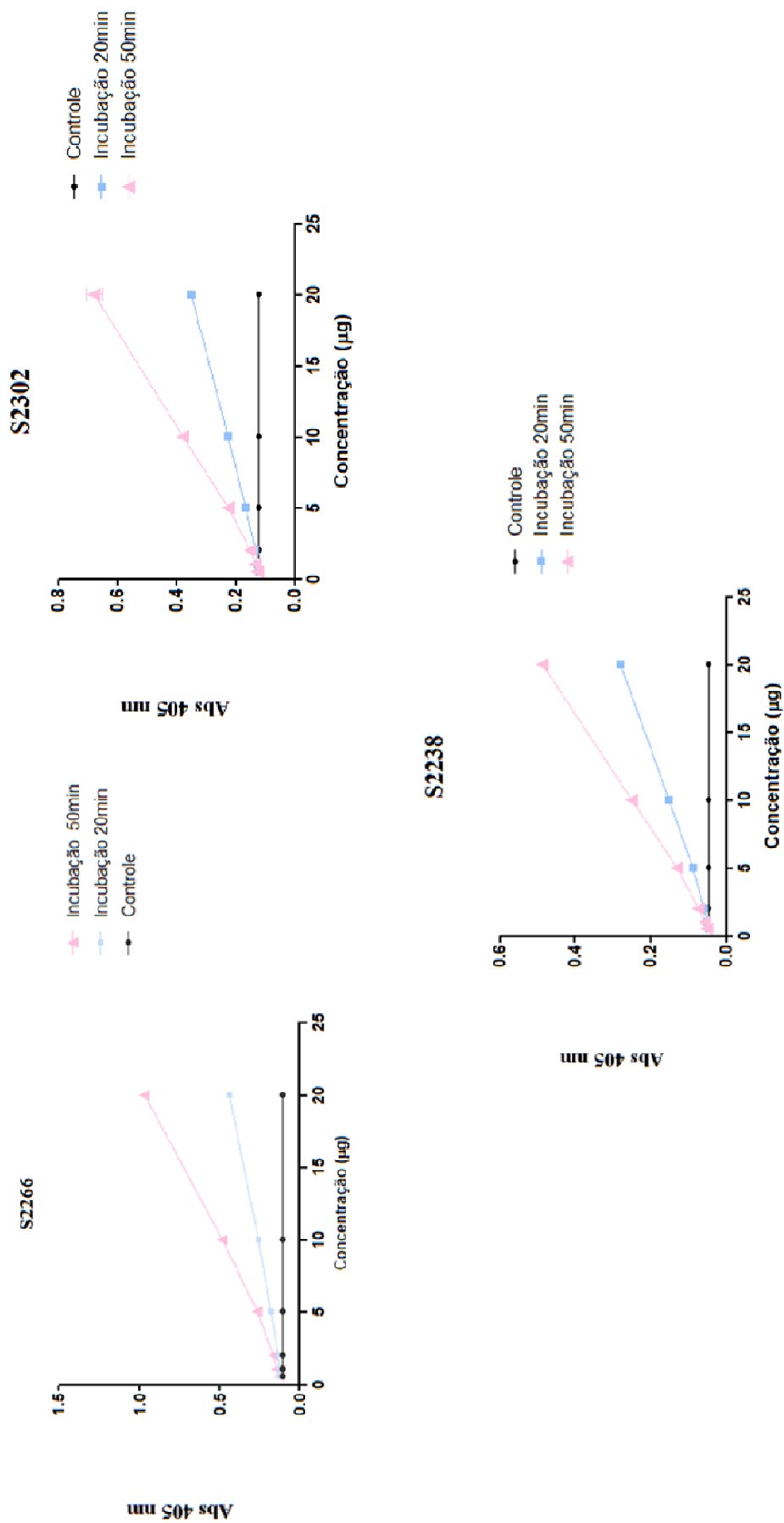


Figura 5. Determinação da atividade amidolítica da BpMP-I sobre diferentes substratos cromogênicos, preparados conforme descrito em materiais e métodos. Atividade proteolítica foi determinada em diferentes concentrações da BpMP-I (0,002µg/µL; 0,005µg/µL; 0,01µg/µL; 0,025µg/µL; 0,05µg/µL; 0,1µg/µL) sobre os substratos S- 2266, S-2302 e S-2238 incubados por 20min e 50min a 37°C, a absorbância foi mensurada a 405nm.

3.4. Ensaio Imunoquímicos

3.4.1. Obtenção e titulação dos anticorpos policlonais anti-Bp e anti-BpMPI

Os anticorpos policlonais anti-Bp e anti-BpMPI foram obtidos após cromatografia de afinidade em Proteína A Sepharose dos soros dos animais imunizados com a peçonha de *B. pauloensis* ou BpMPI (**Figura 6A**). A amostra de interesse, a imunoglobulina G, eluída da coluna no segundo pico, foi reunida num “pool”, sendo depois liofilizada e armazenada a - 4°C para sua posterior utilização nos testes de neutralização.

A titulação dos anticorpos antiBp e anti BpMPI purificados foi realizada utilizando como antígenos a peçonha de *B. pauloensis* e a BpMPI, respectivamente. A reação mostrou se positiva até a diluição de 1:1600 para o antiBpMPI (**Figura 6B**) e 1:12.800 (**Figura 6C**) para o anti-Bp, porém não foi confirmada até onde essa reatividade seria positiva já que não houveram outras diluições além dessa. Os valores de absorbância observados nos ensaios de ELISA para a titulação dos anticorpos anti-BP (**Figura 6C**) foram maiores provavelmente por ser a peçonha bruta constituída por uma mistura complexa de proteínas que teriam induzido uma maior resposta imunológica.

A capacidade dos anticorpos anti-BpMP-I produzidos em camundongos reconhecerem componentes presentes em diferentes peçonhas foi avaliada por ELISA. A reatividade cruzada entre o anticorpo anti-BpMP-I e as peçonhas de *B. pauloensis*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararaca* e *B. leucurus* (**figura 7**) foi verificada até diluição 1:1600, no entanto houve um maior reconhecimento para as peçonhas de *B. leucurus* e *B. jararaca* provavelmente por essas peçonhas expressar uma quantidade maior de metaloproteases homólogas à BpMP-I.

3.4.2. Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha

***B. pauloensis* pelos anticorpos anti-Bp e anti BpMP-I**

A metaloproteinases BpMPI não apresentou atividade hemorrágica (**Figura 8**), porém os anticorpos anti-BpMPI foram eficientes em neutralizar a hemorragia induzida pela peçonha de *B. pauloensis*. A atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de *B. pauloensis* foi completamente neutralizada pelos anticorpos anti-Bp 1:20 (m/m) e anti- BpMP-I 1:50 (m/m) (antígeno-anticorpo) (**Tabela II**).

3.4.3. Neutralização dos distúrbios da coagulação

A neutralização dos distúrbios de coagulação sanguínea induzidos por 10µg da peçonha bruta de *B. pauloensis* foi realizada pela aplicação intraperitoneal das amostras pré-incubadas por 30 minutos a 37°C na razão 1:50 m/m (peçonha total de *B. pauloensis*: anticorpo anti-BpMP-I). Os anticorpos anti-BpMP-I foram eficientes na neutralização deste efeito, uma vez que os tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada permaneceram normais quando comparados com o controle PBS (**Tabela III**). A concentração de fibrinogênio plasmático também permaneceu em níveis normais quando os animais receberam por via intraperitoneal 10µg da peçonha bruta previamente incubada com os anticorpos anti-BpMP-I (**Figura 9**).

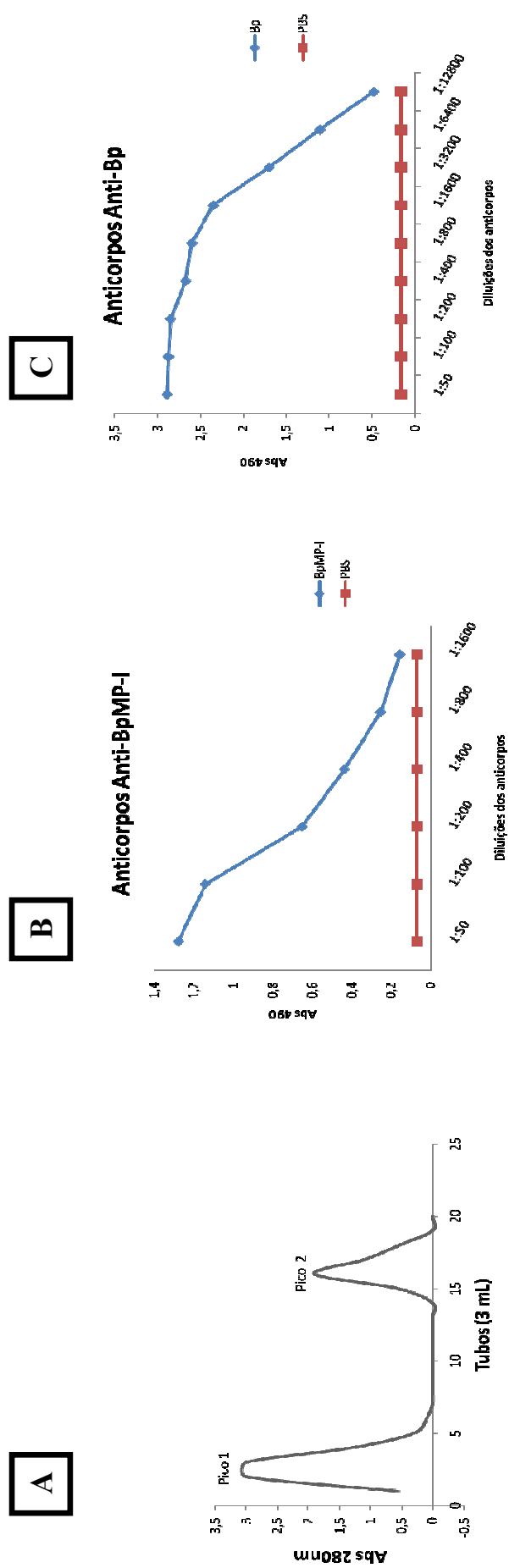


Figura 6. Purificação e titulação de anticorpos policlonais anti-BpMP-I e anti-Bp. **A:** Cromatografia de afinidade em resina Proteína A Sepharose para obtenção das imunoglobulinas G. Fracionamento do soro* anti-BpMP-I obtido de camundongos da linhagem BALB/c. Pico 1: proteínas plasmáticas não identificadas; Pico 2: Imunoglobulinas G. * o soro anti-Bp apresentou o mesmo perfil cromatográfico. **B:** Reatividade específica do anti-BpMP-I de camundongos da linhagem BALB/c contra a própria toxina pelo método ELISA utilizando como controle PBS. **C:** Reatividade do anti-Bp contra a peçonha de *B. pauloensis*, pelo método ELISA, sendo PBS controle.

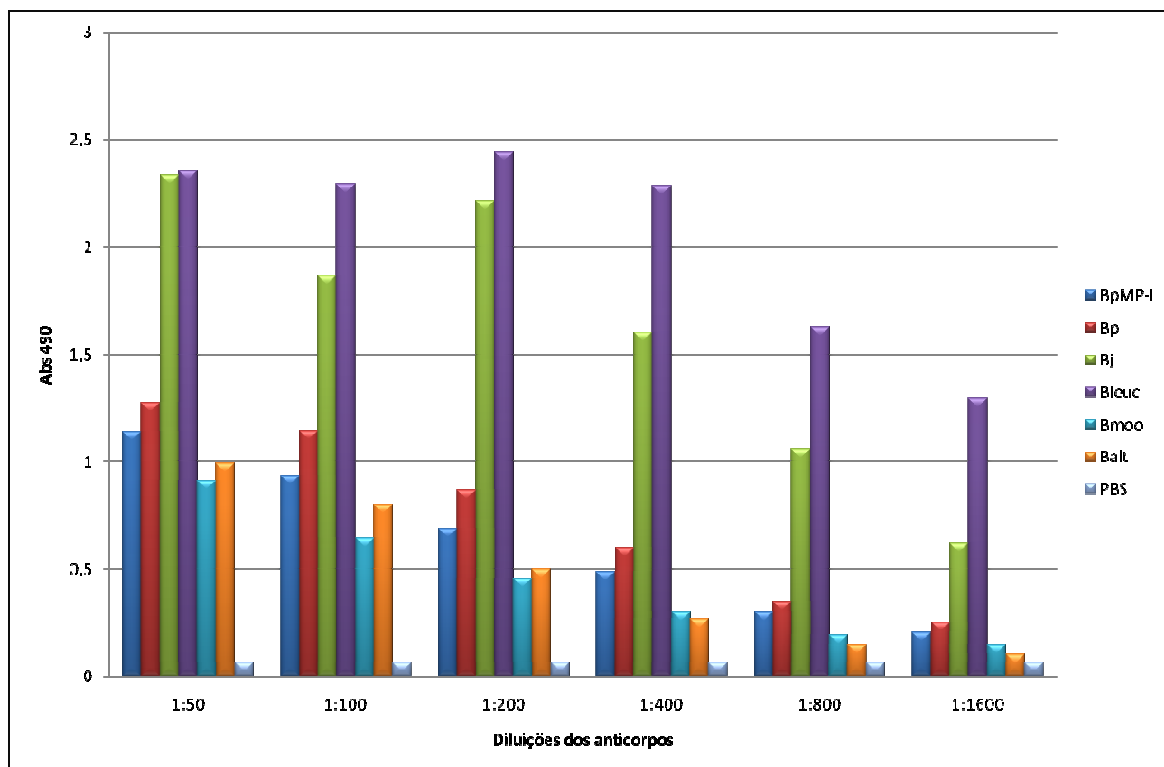


Figura 7. Reatividade-cruzada das Ig G anti-BpMP-I pelo ELISA. BpMP-I, peçonhas: (Bp) *B. pauloensis*, (Ba) *B. alternatus*, (Bj) *B. jararaca*, (Bleuc) *B. leucurus*, (Bmoo) *B. moojeni*, (Balt) *B. alternatus*.

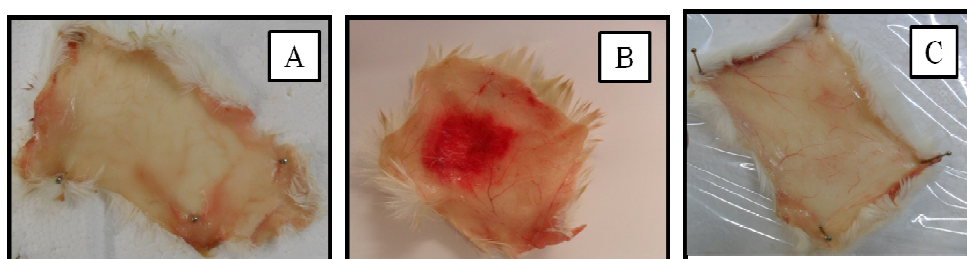


Figura 8: Atividade hemorrágica. (A) Controle negativo – salina 0,9%. (B) Controle positivo – 10µg de peçonha de *B. pauloensis*. (C) 50µg de BpMP-I.

Tabela II: Neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B.pauloensis* (Bp) por anticorpos policlonais anti- *B.pauloensis* e anti-BpMP-I

Amostras	Diâmetro do Halo (mm)	
Salina (0,9%)	0	
Peçonha <i>B. pauloensis</i> (10µg)	14,6 ± 0,43	
Neutralização		
Bp/Anticorpo (m/m)	Anti-Bp	Anti-BpMP-I
1:10	8,1±0,96*	13,1±1,7*
1:20	0*	6,1± 0,93*
1:50	0*	0*

(*) significância $p < 0,05$.

Tabela III: Neutralização dos distúrbios sanguíneos causados pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* por anticorpos anti-BpMP-I

Grupos	TP (seg)	TTPa (seg)
PBS	30	12,5
Bp	+120	+120
Bp/anti-BpMP-I (1:50, m/m)	32	13

TP = Tempo de Protrombina

TTPA = Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

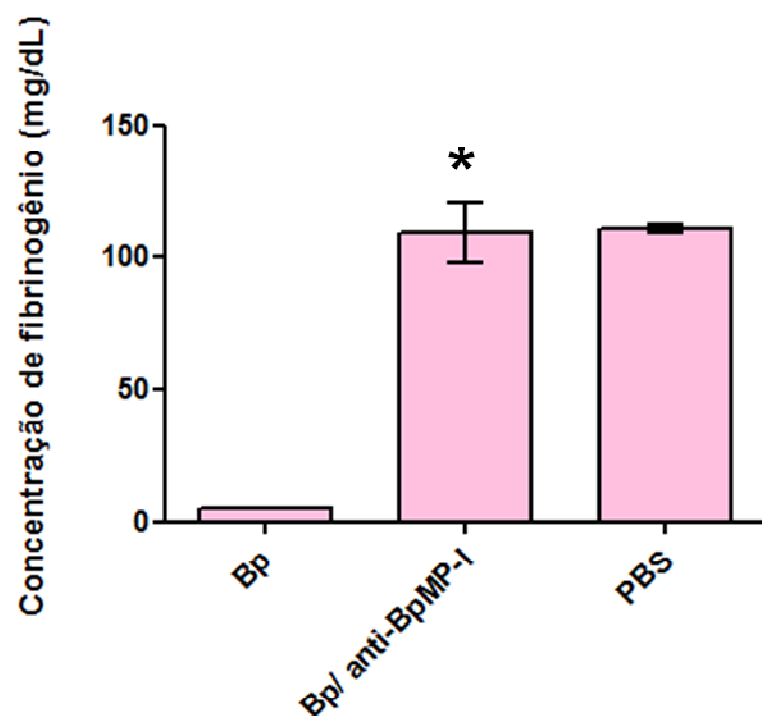


Figura 9. Determinação da concentração de fibrinogênio plasmático após injeções intraperitoneais de 100 μ L de PBS ou 10 μ g/100 μ L da peçonha bruta de *B. pauloensis*. A peçonha (10 μ g/100 μ L) foi previamente incubada com os anticorpos anti-BpMP-I a uma razão de 1:50 (m/m, antígeno:anticorpo) por 1h a 37°C. Resultados são apresentados com média e desvio padrão. (*) significância $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta as características bioquímicas, bem como as principais atividades enzimáticas e biológicas de uma metaloproteinase purificada da peçonha de *B. pauloensis*. Também é demonstrado o potencial neutralizador de anticorpos policlonais anti-peçonha e anti-BpMPI sobre algumas alterações sistêmicas e locais induzidas pela peçonha de *B. pauloensis*.

Para a purificação desta toxina utilizou-se uma cromatografia de troca-iônica em gel de CM-Sepharose, onde foram obtidas seis frações (**Figura 1A**). Seguida de uma filtração molecular da fração de interesse (CM3) em gel de Sephacryl S-300 (**Figura 1B**). Neste segundo passo cromatográfico obtivemos a toxina BpMP-I (Metaloproteinase de peçonha de *B. pauloensis*), representando 2,26% das proteínas totais presentes na peçonha bruta (**Tabela 1**). Essa mesma fração foi recromatografada em um sistema de HPLC-RP (**Figura 1C**) com o intuito de se avaliar o grau de pureza e de se obter, eventualmente, essa fração para se proceder com os ensaios de sequenciamento.

Análises em SDS-PAGE na presença e ausência de agentes redutores demonstraram que a metaloproteinase BpMPI apresenta massa molecular aproximadamente de 23kDa e 20kDa, respectivamente (**Figura 1D**). Esta diferença pode ser explicada pelo fato de a migração da molécula na eletroforese ser dependente do seu tamanho molecular. Portanto, na presença de β -mercaptoetanol, a proteína sofreu uma desnaturação mais efetiva devido ao rompimento das pontes dissulfeto, aumentando assim o seu tamanho aparente e diminuindo sua migração em relação à proteína sem β -mercaptoetanol. A massa molecular da BpMPI encontrada é semelhante às SVMPs da classe P-I, como a

BaP1(WATANABE et al., 2003), Leucurolisina-a (BELLO et al., 2006) e a BleucMP (GOMES et al., 2011)

Já foram isoladas da peçonha duas PLA₂ Lys-49 básicas (SOARES et al., 2000), duas PLA₂ Asp 49 básicas (RODRIGUES et al., 2004) uma PLA₂ ácida (RODRIGUES et al., 2006), uma serinoproteinase *Thrombin-like* (COSTA et al., 2009) e uma L-aminoacido oxidase (RODRIGUES et al., 2009).

A estrutura primária foi parcialmente determinada pelo sequenciamento de fragmentos obtidos pela digestão da enzima com a tripsina. A seqüência parcial obtida apresenta os resíduos de aminoácidos do sítio ligante de Zinco (resíduos 170 a 180). A seqüência parcial da BpMPI (**Figura 2**) foi alinhada com seqüências de outras metalloproteinas depositadas nos bancos de proteínas SWISS-PROT/ TREMBL utilizando os programas FASTA 3 e BLAST. A seqüência da BpMPI revelou alta similaridade com outras SVMPs (classe PI). Duas sequencias de consenso presentes nessa classe de enzimas foram identificadas: (H₁₇₀E₁₇₁XXH₁₇₄XXG₁₇₇XXH₁₈₀ e A₁₂₄Q₁₂₅L₁₂₆L₁₂₇T₁₂₈), bem como resíduos conservados de (185, 187,192, 209, 225) os quais podem estar envolvidos na formação de pontes dissulfeto (WATANABE et al., 2003; AKAO et al., 2010)

A BpMPI apresentou atividade azocaseinolítica dose dependente (**Figura 3**) sendo mais ativa em pH 7.5 e 8, semelhante as SVMPs que frequentemente apresentam ótima atividade em faixas de pHs que vão de neutro a básico (MANNING, 1995; XU et al., 2004). Assim como a acutolisina-A (SVMP PI de *Agkistrodon acutus*), apresentou decréscimo da atividade proteolítica quando em pH ácido igual a 3 (ZHU et al., 1997). A perda de atividade está relacionada com alteração no resíduo Glu₁₇₇ (essencial a catálise) e com o estado de protonação

dos resíduos de His presentes no sítio ativo. (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

BpMP-I apresentou atividade azocaseinolítica quando submetida a baixa temperatura (4°C) e essa atividade diminuiu quando a enzima foi pré-aquecida em elevadas temperatura. Após 60° a enzima perdeu 100% de sua atividade. Estes resultados foram demonstrados para outras proteases dessa classe como a BthMP (GOMES et al., 2009) e Neuwiedase (RODRIGUES et al., 2000).

Os resultados provenientes da atividade fibrinogenolítica revelaram que a toxina degrada preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio com 5 minutos de incubação e que com 30 minutos as cadeias A α e B β são totalmente consumidas. Com estes dados podemos inferir que essa protease pode interferir na cascata de coagulação durante o envenenamento. Outras metaloproteinases, com atividade semelhante, já foram isoladas de outras peçonhas de serpentes, como a BmHF-I (*Bothrops marajoensis*) (TORRES-HUACO et al., 2010), botrojarativase (*B. jararaca*) (BERGER, et al.; 2008), atroxlisina-I (*B. atrox*) (SANCHEZ et al., 2010).

As enzimas fibrinogenolíticas presentes nas peçonhas de serpentes podem ser classificadas de acordo com a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio. As proteases responsáveis por clivar a cadeia α A são denominadas α -fibrinogenases, enquanto que as responsáveis por clivar a cadeia β B são denominadas β -fibrinogenases (SWENSON; MARKLAND, 2005). Alterando o local de reconhecimento pela trombina impossibilitando a clivagem correta do fibrinogênio para a formação da fibrina (SWENSON; MARKLAND, 2005). De acordo com o padrão de hidrólise das cadeias do fibrinogênio, sugere-se que a BpMPI seja uma α -fibrinogenase.

Algumas das proteínas fibrinogenolíticas tem sido utilizadas clinicamente como anticoagulantes ou estão em fase de investigação para uma possível aplicação terapêutica (BRAUD et al, 2000; LEWIS;GARCIA, 2003; MARSH, 2001).

A inibição da atividade proteolítica da metaloproteinase sobre o fibrinogênio bovino foi visualizada na presença de EDTA, 1,10-fenantrolina e β -mercaptoetanol. Nos dois primeiros casos a BpMP-I mostrou dependência para Zn^{++} , uma vez que foi inibida na presença de EDTA e 1,10-fenantrolina. A perda de atividade na presença de β -mercaptoetanol está relacionada com a perda de sua conformação proveniente da quebra das pontes dissulfetos. Enquanto que na presença de inibidores específicos para serinoproteases, benzamidina e aprotinina, a atividade proteolítica não foi afetada.

BpMP-I foi capaz de hidrolizar os substratos cromogênicos S-2302 e S-226. O substrato S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA $\cdot$ 2HCl), é específico para caliceína plasmática, enquanto que o S-2266 (H-D-Val-Leu-Arg-pNA $\cdot$ 2HCl) é um substrato para caliceína glandular. As calíceínas glandular e plasmática fazem parte de um complexo de multiproteínas, que são responsáveis pela liberação de cininas a partir dos cininogênios de alto e baixo peso molecular. As cininas por sua vez exercem diversas atividades farmacológicas intermediadas por receptores (B1 e B2) (MOREAU et al, 2005).

A BpMP-I apresentou leve atividade catalítica sobre o substrato S2238, no entanto, essa toxina não coagulou o plasma bovino (atividade coagulante) e nem a solução de fibrinogênio (1mg/mL). A protease não apresentou atividade sobre os substratos S-2222 (substrato para fator Xa) e S-2251 (substrato para plasmina).

A metaloproteinase BpMPI não apresentou atividade hemorrágica (Figura 8C) mesmo utilizando altas concentrações de toxina purificada. Assim como foi demonstrado para outras metaloproteinases não hemorrágicas, neuwiedase (RODRIGUES et al, 2000) e fibrolase (GUAN et al., 1991).

O presente trabalho também teve como objetivo produzir anticorpos policlonais anti-metaloproteinase em camundondos e avaliar o seu potencial em neutralizar a hemorragia local e as alterações na coagulação sanguínea induzidas pela peçonha de *B. pauloensis*.

Vários trabalhos vêm tentando buscar métodos alternativos para melhorar a neutralização dos efeitos tóxicos induzidos pelo envenenamento ofídico. Rodrigues e colaboradores (2001) demonstraram a capacidade de anticorpos policlonais anti-metaloproteinases (neuwiedase) produzidos em coelhos em neutralizar a atividade hemorrágica da peçonha bruta de *B. neuwiedi*, evidenciando reação imunológica cruzada entre a neuwiedase e outras metaloproteases hemorrágicas da peçonha.

Uma biblioteca de peptídeos sintéticos com 12 aminoácidos expressos na superfície do capsídeo viral de bacteriófagos foi utilizada para obter epítomos (mimetopos) que são reativos ao anticorpo policlonal anti-neuwiedase (CARDOSO, 2004). O alinhamento de suas seqüências com as estruturas primária e terciária da neuwiedase e outras metaloproteinases presentes em peçonhas de serpentes permitiu a seleção de vários mimetopos os quais foram utilizados posteriormente para imunizar camundongos BALB/c. A antigenicidade e a especificidade da mistura de mimetopos foram confirmadas por ensaios de Dot blot, ELISA e Western blot. Assim, dois epítomos foram mapeados e posteriormente encontrados nas seqüências primárias de várias SVMP, o sugere

a aplicação de novas metodologias para a busca de antígenos que possam melhorar a produção e a eficiência dos soros antiofídicos.

Assim, é possível enriquecer o soro antiofídico com altos títulos de anticorpos anti-metaloproteases, pois estes podem melhorar a eficiência do tratamento em relação às alterações locais e sistêmicas induzidas por envenenamentos botrópicos. Já que os anticorpos reconhecem diferentes metaloproteases presentes em diversas peçonhas botrópicas e a capacidade de neutralizar provavelmente esteja relacionada com os epitopos reconhecido pelo anticorpo (**figura 7**).

Os ensaios de neutralização com os anticorpos produzidos contra a peçonha de *B. pauloensis* e a metaloproteinase BpMPI foram realizados utilizando-se as razões 1:10, 1:20 e 1:50 (m/m), toxina/anticorpo, sendo que a mistura antígeno anticorpo foi previamente incubada a 37°C por 30 minutos.

Os anticorpos anti-Bp e anti-BpMPI inibiram eficientemente a ação hemorrágica da peçonha de *B. pauloensis* (Tabela II). Embora a metaloproteinase BpMPI não seja hemorrágica (**Figura 8C**) foi capaz de inibir a ação hemorrágica induzida pela peçonha de *B. pauloensis*. A capacidade dos anticorpos anti-BpMPI em inibir a ação hemorrágica estaria no provável reconhecimento destes anticorpos a domínios estruturais presentes nas diferentes metaloproteínas responsáveis pelo quadro hemorrágico da peçonha bruta, uma vez que as metaloproteínas presentes nas peçonhas de serpentes dividem uma grande homologia estrutural.

A coagulopatia é um efeito comum observado após o envenenamento botrópico e botropóico. Estas alterações são causadas por diferentes enzimas

que são capazes de interferirem na hemostasia. Já é bem descrito que as metaloproteinases de peçonhas ofídicas degradam proteínas da matriz extracelular e dessa forma podem colaborar para o espalhamento de toxinas principalmente serinoproteíases que podem degradar proteoliticamente várias proteínas plasmáticas dentre elas o fibrinogênio e o fator de von-Willebran.

Os anticorpos anti-BpMP-I foram também eficientes na neutralização das alterações da coagulação sanguínea induzidas pela peçonha de *B. pauloensis* uma vez que os tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada permaneceram normais quando comparados com o controle PBS (**Tabela III**). A concentração de fibrinogênio plasmático também permaneceu inalterada após neutralização com os anticorpos anti-BpMP-I (**Figura 9**).

Várias propostas surgem com a finalidade de diminuir ou até mesmo inibir completamente os danos locais e sistêmicos induzidos pelos venenos e ou suas toxinas isoladas. Uma combinação da rápida administração de antivenenos com altos títulos contra estas poderiam melhorar satisfatoriamente principalmente o dano tecidual local que é um dos sintomas mais agravantes no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides*.

De acordo com suas características bioquímicas, enzimáticas e farmacológicas, a BpMPI pode ser considerada uma nova metaloproteinase fibrinogenolítica e anticoagulante isolada da peçonha de *B. pauloensis*. Esta foi capaz de induzir a produção de anticorpos policlonais eficientes na neutralização de alguns efeitos biológicos induzidos pela peçonha bruta de *B. pauloensis*.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAO, P.K.; TONOLI, C.C.C.; NAVARRO, M.S.; CINTRA, A.C.O.; NETO, J.R.; ARNI, R.K.; MURAKAMI, M.T., Structural studies of BmooMP α -I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, v. 55, p. 361-368, 2010.

ANAI, K., SUGIKI, M., YOSHIDA, E., MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 40, p. 63 – 68, 2002.

ASSAKURA, M.T.; FURTADO, M.F.; MANDELBAUM, F.R. Biochemical and Biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comparative Biochemistry Physiology** **102B**, v.4, p.727-732, 1992.

BALDO, C.; TANJONI, I.; LEÓN, I.R.; BATISTA, I.F.C.; DELLA-CASA, M.S.; CLISSA, P.B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTE-MENDES, G.P.; RODRIGUES, V.M.; PERALES, J.; VALENTE, R.H.; MOURA-DASILVA, A.M. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v.51, p. 54-65, 2008.

BELLO, C.A.; HERMOGENES, A.L.N.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, L.H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, p. 189-200, 2006.

BERGER, M.; PINTO, A.F.M.; GUIMARÃES, J.A. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p.488-501, 2008.

BÉRNILS, R.S. (org.). 2010. Brazilian reptiles – List species. Acessado em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Consultado em 28/07/2011.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, p.325-372, 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the qualitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteine-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

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

CARDOSO, RONE. Isolamento e caracterização de peptídeos sintéticos por Phage Display pela interação de anticorpos policlonais anti-Neuwiedase da

peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* 2004. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

COSTA, F.L.S.; RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.M.; MENALDO, D.L.; HAMAGUCHI, A.; HONSI-BRANDEBURGO, M.I.; FULY, A.L.; SOARES, S.G.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.54, 725-735, 2009.

CRUZ, L.S.; VARGAS, R.; LOPES, A.A. Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethnicity & Disease**, v. 19, p. 41-46, 2009.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L.; 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**, v. 156, p. 617-640, 2009.

FERREIRA, R.N.; RATES, B.; RICHARDSON, M.; GUIMARÃES, B.G.; SANCHEZ, E.O.F.; PIMENTA, A.M.C.; NAGEM, R.A.P. Complete amino-acid sequence, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of leucurolysin-a nonhaemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Acta Crystallografica Section F**, v.65, p. 798-801, 2009.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**, v.275, p 3016-3030, 2008.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos . **Ministério da Saúde-Brasil**. 112 pp, 2001.

GOMES, M.S.R., MENDES, M.M., OLIVEIRA, F., ANDRADE, R.M., BERNARDES, C.P., HAMAGUCHI, A., ALCÂNTARA, T.M., SOARES, A.M., RODRIGUES, V.R., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v.53, p.24-32, 2009.

GOMES, M. S. R.; QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C. N.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOUSA , M. V.; AQUINO, E. N.; CASTRO, M. S.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 153, p. 290–300, 2011.

GUAN, A.L., RETZIOS, A.D., HENDERSON, G.N., MARKLAND, F.S.JR. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 289, p.197-207, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCUVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochemie**, v.82, p 841-850, 2000.

GUTIERREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage, **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

HOSER, R. A reclassification of the Rattlesnakes; species formerly exclusively referred to the Genera *Crotalus* and *Sistrurus*. **Australasian Journal of Herpetology**, v.6, p. 1-21, 2009.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p 680-5, 1971.

LAING, D.G; CLISSA, P.B; THEAKSTON, R.D.G; MOURA, DA.S; TAYLOR, M.J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloprotease-induced skin necrosis. **European Journal Immunology**, v.33, p 3458-3463, 2003.

LEWIS, R.J., GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature reviews. Drug Discovery**, v. 2, p.790-802, 2003.

MAGALHAES, G.S.; FURLAN, M-S.; CAPORRINO, C.; VALENTE, R.H.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Evidences of RNA processing as a complementary mechanism for structural diversification of snake venom metalloproteinases. Submitted JUN-2010 to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

MANNING, M.C. Sequence analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from *Agkistrodon contortrix contortrix*. **Toxicon**, v. 33, p. 1189-1200, 1995.

MARSH, N.A. Diagnostic uses of snake venom. **Haemostasis**, v.31, p. 211-217, 2001.

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

MOREAU, M.E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The Kallikrein-Kinin system: current and future pharmacological targets. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, p. 6-38, 2005.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and Biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Archives Biochemistry and Biophysic.** v.231, p 309-311, 1984.

OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI BRANDEBURGO, M. I. Purification and characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (caissaca). **Biochemistry Molecular Biology International**, v. 47, p. 1069-1077, 1999.

RUCUVADO, A; ESCALANTE, T; TEIXEIRA, C.F; FERNANDES, C.M; DIAZ, C; GUTIÉRREZ, J.M. Incrementes in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators Inflamm.** v.11, p 121-128, 2002.

RAMOS, O.H.P; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Snake venom metalloprotease-structure and function of catalytic and desintegrin domains. **Comparative biochemistry and Physiology – parte C** 142, p 328-346, 2006.

RODRIGUES,V.M., SOARES, A. M., GUERRA-SÁ, R., RODRIGUES, V., FONTES, M. R. M. AND GIGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.381, n. 2, p.213-224, 2000.

RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; MARCUSSI, S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, p 305-314, 2004.

RODRIGUES, R.S. *Purificação e caracterização de uma PLA₂ de Bothrops pauloensis*. Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

RODRIGUES, R.S., SILVA, J.F., BOLDRINI-FRANÇA, J., FONSECA, F.P.P., OTAVIANO, A.R., SILVA, F.H., HAMAGUCHI, A., MAGRO, A.J., BRAZ, A.S.K., SANTOS, J.I., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., FONTES, M.R.M., FULY, A.L., SOARES, A.M., RODRIGUES, V.M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, new L-amino acid oxidase from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, p. 490-501, 2009.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; SANCHEZ, E.E.; MÁRQUEZ, A.; CARVAJAL, Z.; SALAZAR, A.M.; GIRON, M.E.; ESTRELLA, A.; GIL, A.; GUERRERO, B. Hemostatic properties of Venezuelan *Bothrops* snake venoms with special reference to *Bothrops isabelae* venom. **Toxicon**, v. 56, p. 926-935, 2010.

SANCHÉZ, E.F., SCHNEIDER, F.S., YARLEQUE, A., BORGES, M.H., RICHARDSON, M., FIGUEIREDO, S.G., EVANGELISTA, K.S., EBLE, J.A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake

venom acts both on blood vessel ECM and platelets. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.496, p.9-20, 2010.

SILVA, V.X. Revisão sistemática do complexo e *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). v.1e 2. Tese (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SILVA, V.X.; RODRIGUES, M.T. Taxonomic revisión of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, n.1, p. 45-90, 2008.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of BnSP-7, a Lys49 Myotoxic Phospholipase A₂ Homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, p. 201-209, 2000.

SRIPRAPAT, S.; AEKSOWAN S.; SAPSUTTHIPAS, S.; CHOTWIWATTHANAKUN, C.; SUTTIJITPAISAL .P; PRATANAPHON, R.; KHOW, O.; SITPRIJA, V.; RATANABANANGKOON, K. The impact of a low dose, low volume, multi-site immunization on the production of therapeutic antivenoms in Thailand. **Toxicon**, v. 41, p.57-64., 2003

SWENSON, S; MARKLAND JR, F.S. Snake Venom Fibrinolytic enzymes. **Toxicon**, v.45, p 1021-1039, 2005.

TEIXEIRA, F.P.C; FERNANDO CHAVES; STELLA, R.ZAMUNÉR; CRISTINA.M.FERNANDES; JULIANA.P.ZULIANI; MARIA ALICE CRUZ-HOFLING; IRENE FERNANDES; GUTIÉRREZ,J,M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **International Journal of Experimental Pathology**, v.86, p 107-115, 2005.

TORRES-HUACO, F.D., PONCE-SOTO, L.A., MARTINS-DE-SOUZA, D., MARANGONI, S. Purification and characterization of a new weak hemorrhagic metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* snake venom. **Protein Journal**, v. 29, p.407-416, 2010.

WATANABE, L.; SHANNON, J.D.; VALENTE, R.H.; RUCAVADO, A.; ALAPE-GIRÓN, A.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake that exerts multiple tissue-damaging activities, **Protein Science**, v.12, p. 2273-2281, 2003.

WALKER, J.M. The Protein Protocol Handbook. **Human Press Journal** , p. 695-698, 1996.

WILSON, K.J.; YUAN, P.M. Protein and peptide purification, in: J.B.C. Findlay, M.J. Geisow (Eds.), **Protein Sequencing a Practical Approach**, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 1989, pp. 3–41.

WHITE, J. Snake venom coagulopathy. **Toxicon** v.45, p. 951-957, 2005.

XU, X.L.; LIU, X.H.; WU, B.; LIU, Y.; LIU, W.Q.; XIE, Y.S.; LIU, L.Q. Metal-ion- and pH-induced conformational changes of acutolysin D from *Agkistrodon acutus* venom probed by fluorescent spectroscopy. **Biopolymers**, v. 74, p. 336-344, 2004.

ZHU, X.Y.; ZHU, Z.L.; GONG, W.M.; TENG, M.K.; NIU, L.W. Studies on relationship between the biological activities and circular dichroism of south Anhui *Dienagkistrodon acutus* hemorrhagins. **Sheng Wu Hua Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao** (Shanghai) 29, p. 163-169, 1997.