

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

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE BthMP:
UMA NOVA METALOPROTEINASE DO
VENENO DE Bothrops moojeni(Caiçaca)

Mário Sérgio Rocha Gomes

Prof^ª Dr^a Maria Inês Homsí Brandeburgo

UBERLÂNDIA-MG
2006

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

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE BthMP:
UMA NOVA METALOPROTEINASE DO VENENO
DE Bothrops moojeni(Caiçaca)

Mário Sérgio Rocha Gomes

Prof^a Dr^a Maria Inês Homsí Brandeburgo

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
2006

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

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE BthMP:
UMA NOVA METALOPROTEINASE DO VENENO DE
Bothrops moojeni(Caiçaca)

Mário Sérgio Rocha Gomes

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Inês Homs Brandeburgo (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Jeanne Claine de Albuquerque Modesto

Prof . Dr. Andreimar Martins Soares

Data da Defesa: 05 /12 /2006

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

(Prof^a Dr^a Maria Inês Homs Brandeburgo)

UBERLÂNDIA-MG
2006

G633p Gomes, Mário Sérgio Rocha, 1968-
Purificação e caracterização bioquímica de BthMP : uma
nova meta-

Loprotênase do veneno de *Bothrops moojeni* (Caiçaca) /

Mário Sérgio Rocha Gomes. - 2006.

70 f. : il.

Orientador: Maria Inês Homsí Brandeburgo.

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

Inclui bibliografia.

**1. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 2. Bothrops -
Teses. 3. Protei-
nase - Teses. I. Brandeburgo, Maria Inês Homsí. II.
Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética
e Bioquímica. III. Título.**

CDU:

615.919:598.126

DEDICATÓRIAS

❖ *Dedico este trabalho em memória da minha mãe Julita Rocha Gomes (mulher forte, retrato da simplicidade, senhora do silêncio), ao meu pai Carlos Ulisses Gomes, ao meu sogro José Felix da Silva (homem simples, alegre e lutador) e a Dona Esmeralda (mulher cativante).*

❖ *Dedico às mulheres da minha vida, minha esposa Rose e minhas filhinhas Ana Karolina (Karol) e Gabriela (Byba), vocês são um verdadeiro presente de DEUS na minha vida.*

❖ *Aos meus irmãos Normalúcia, Norma Sueli, Norma Celeste, Paulo Sérgio, Norma Cristina e Maria Sófia.*

❖ *Acima de tudo dedico este trabalho ao DEUS da misericórdia, Senhor de todas as coisas, Deus da verdade, que proporcionou a realização desta etapa de minha vida, e a Maria santíssima intercessora perpetua, mensageira do DEUS CRISTO JESUS.*

AGRADECIMENTOS

❖ *A Prof^aDr^a Maria Inês Homsí Brandeburgo, por ter me aceito como seu orientando, pela sua constante e importante orientação, dedicação e empenho no desenvolver deste trabalho, pelo seu sorriso incentivador.*

❖ *A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, que me proporcionou condições financeiras para a realização deste trabalho.*

❖ *A Rodrigo Magrin, que por intermédio da Prof^a Maria Inês, me passou este trabalho e me deu as primeiras informações acerca de como desenvolvê-lo.*

❖ *As Professoras Amélia Hamaguchi, Veridiana de Melo e Hérica Lima pela constante colaboração neste trabalho, em especial a Prof^a Hérica na colaboração e dedicação da atividade caseinolítica por espectrofotometria.*

❖ *Aos professores: Dr^a Amélia Hamaguchi (Estrutura e Função de Proteínas), Prof. Dr. Foued S. Espindola (Bioquímica e Biologia Molecular da Célula; Seminário em Biologia Celular e Molecular do Citoesqueleto e Proteínas Motoras), Prof. Dr. Malcon A. Manfredi Brandeburgo (Genética do Comportamento e Evolução), Milton Vieira Coelho (Purificação e Caracterização de Proteínas), Veridiana de Melo (Tópicos em Bioquímica Clínica e Fisiologia), Nilson Penha Silva (Enzimologia; Biogerontologia), que ao longo deste período contribuíram na minha formação acadêmica com importantes informações teóricas.*

❖ *A Mirian Machado pela sua constante colaboração e pelo seu apoio desde que cheguei no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais.*

❖ *Aos colegas Fabio Lucas, Johara e Daiana, que foram os primeiros os quais acompanhei no aprendizado das atividades práticas.*

❖ *A todos os outros Colegas do laboratório: Renata, Danilo, Luis Henrique, Luciana, Karol, Luis Fernando, Leonando, Luis Carlos, Marília que contribuíram no aprendizado cotidiano.*

❖ *A Prof^a Dr^a Tânia (Patologia), na colaboração pela confecção das lâminas histológicas.*

❖ *A Prof^a Dr^a Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo, pela sua receptividade e atenção durante o meu curto período na UFScar – São Carlos, na tentativa de realizar a seqüência N-Terminal.*

❖ *A Prof^a Dr^a Eliane C. A. Braga da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP de Ribeirão Preto, pela colaboração na realização da focalização isoelétrica.*

❖ *Agradeço a todos os funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica: Gerson, Marlene, Sr. Vilmar, Tíaninha, D. Nenzinha, Cleuber; que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

❖ *Ao Instituto Valeé e Pentapharm do Brasil pelo fornecimento de animais para os ensaios biológicos.*

SUMÁRIO

- Lista de Abreviaturas

- Lista de Figuras

1- Introdução Geral.....01

2- Objetivos.....12

2.1- Objetivo Geral.....13

2.2- Objetivos Específicos.....13

3- Referências Bibliográficas.....14

4- Capítulo Único (BthMP: Uma Metaloproteinase do Veneno de *Bothrops moojeni*(Caiçaca)).....21

-Resumo.....22

-Abstract.....23

5- Introdução.....24

6- Materiais e Métodos.....27

6.1 Obtenção da peçonha de *Bothrops moojeni* e dos animais.....28

6.2 Resinas e Reagentes Utilizados em Cromatografia, Eletroforese, Ensaio
Enzimáticos e Biológicos.....28

6.3 Fracionamento da Peçonha de *Bothrops moojeni* e obtenção de BthMP.....28

6.4 Determinação quantitativa de proteínas.....	29
6.5 Características Químicas.....	30
6.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (PAGE-SDS).....	30
6.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas p/ proteínas básicas.....	30
6.5.3 Focalização Isoelétrica.....	31
6.5.4 Determinação da sequência N-terminal.....	31
6.6 Caracterização Enzimática.....	32
6.6.1 Atividade de degradação do Fibrinogênio.....	32
6.6.2 Estabilidade da Metaloproteinase BthMP frente ao pH e a Temperatura.....	32
6.6.3 Atividade Fibrinolítica.....	32
6.6.4 Atividade Coagulante sobre o Plasma Bovino.....	33
6.6.5 Atividade esterásica sobre o TAME.....	33
6.6.6 Atividade Hemolítica indireta (Fosfolipase A ₂).....	34
6.6.7 Atividade Caseinolítica por Espectrofotometria.....	34
6.7 Atividades Biológicas.....	35
6.7.1 Atividade Hemorrágica.....	35
6.7.2 Atividade Edematogênica.....	36
6.7.3 Atividade Desfibrinogenante.....	36
6.7.4 Análise Morfológica Induzida em Músculos Gastrocnêmio de Camundongos.....	36
6.8 Análise Estatística.....	37
 7- Resultados e Discussão.....	 38
 8- Referências Bibliográficas.....	 54

LISTA DE ABREVIATURAS

AMBIC- Tampão bicarbonato de amônio

Bis- acrilamida- N, N'-metileno-bis-acrilamida

BthMP- Metaloprotease do veneno de *Bothrops moojeni*

DEAE- Grupo dietilaminoetil

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

EGTA- Ácido etilenoglicol bis(β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético

PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida

PB- Peçonha bruta

PBS- Tampão fosfato em salina

SDS- Dodecil sulfato de sódio

SVMPs- Metaloprotease do veneno de serpentes

TAME- N-p-tolueno-sulfonil arginina metil ester

TCA- Ácido tricloroacético

TEMED- N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina

TRIS- Tris-[hidroximetil]-aminometano

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 01-Diferenciação das serpentes Peçonhentas e Não-Peçonhentas (pág. 04).

Figura 02-Diagrama esquemático da divisão das metaloproteinases de venenos de serpentes, conforme a composição estrutural das enzimas (pág. 08).

Figura 03-Diagrama esquemático da divisão das metaloproteinases de venenos de serpentes, com modificações propostas por Fox & Serrano (pág. 10).

CAPITULO ÚNICO

Figura 01-Purificação de BthMP (Pág. 40).

Figura 02-Atividade Proteolítica de BthMP (pág. 43)

Figura 03-Atividade Fibrinolítica e Edematogênica de BthMP e da peçonha de *Bothrops moojeni* (pág. 47).

Figura 04-Atividade Hemorrágica (pág. 49).

Figura 05-Fotomicrografia de alterações induzidas no músculo gastrocnêmio de camundongos (pág. 51).

1- INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo dos primórdios as serpentes vêm despertando no homem (Folclore ou Fatos verídicos) um interesse, curiosidades, magia, filosofia, misticismo. Elas tornaram-se símbolos diversificados ao longo das décadas e séculos, como em citações bíblicas, nos livros de Gênesis, Apocalipse e outros, nos quais a serpente é retratada como a simbologia da traição, do perigo, da luta entre o bem e o mal. Esta referência tornou-se popular com ditos dos mais variados possíveis. As serpentes também foram descritas como símbolo da alquimia, representando a pedra filosofal, o material que seria transformado em ouro, objeto de cobiça, riqueza e ganância da humanidade. Ela também é símbolo na medicina e farmácia, como aquela que pode tanto promover a cura como levar a morte.

Esta sedução das serpentes que transcorre ao longo dos milênios, certamente é um foco natural que desperta nos pesquisadores de diversas áreas o interesse por este réptil, assim como desvendar a composição e atividades biológicas das peçonhas produzidas por este fascinante membro do mundo animal. Certamente ao realizarmos um levantamento sobre as diversas publicações nas revistas especializadas em toxinologia e farmacologia, as peçonhas de serpentes são, sem sombra de dúvidas, as mais estudadas e com maior número de publicações e pesquisas (Guimarães and Carlini, 2004; Ramos and Selistre-de-Araujo, 2006). Pois este objeto (Serpentes) que transcorre da cultura popular às comprovações científicas, guarda em suas peçonhas um deslumbrante mundo molecular que já tem contribuído com o desenvolvimento de potenciais produtos farmacêuticos para combater diversas enfermidades e com certeza irá contribuir mais e mais ao longo dos anos vindouros, pois a pesquisa nesta área tem se mostrado promissora e caminha a largos passos.

A Palavra “Serpente” tem origem do latim: *serpens* + *antis*, que significa rastejante; quem se arrasta. As serpentes constituem um grupo de répteis reconhecível principalmente pelo longo corpo flexível, essencialmente sem patas, e pelas modificações que lhes permitem alimentar-se de grandes animais, engolindo-os inteiros. Não possuem cintura escapular, nem pálpebras móveis, tampouco tímpanos ou aberturas externas do ouvido (Barraviera, 1999). Alguns estudos sugerem que as serpentes apareceram a cerca de 100-150 milhões de anos atrás no período Cretáceo (Barraviera, 1999; Cardoso et al, 2003 e Ramos

and Selistre-de-Araujo, 2006). Porém, ainda não se chegou a uma conclusão de consenso sobre a origem da serpente ancestral. Isto pode ser por que os fósseis mais antigos reconhecidos como serpentes mostram um estágio avançado de evolução e não revelam informações acerca de sua origem. A semelhança entre as serpentes e os lagartos (Varanóideos) levou muitos autores a afirmar que eles tiveram um ancestral estreitamente relacionado (Barraviera, 1999; Cardoso et al, 2003). Há, contudo várias hipóteses para a origem das serpentes, elas podem ter se originado de forma aquática e subsequentemente emergido para a terra; surgido de lagartos terrestres (Sáurios Lacertília) ou que os ancestrais das serpentes eram formas cavadoras, daí o seu corpo alongado e extremamente flexível (Barraviera, 1999).

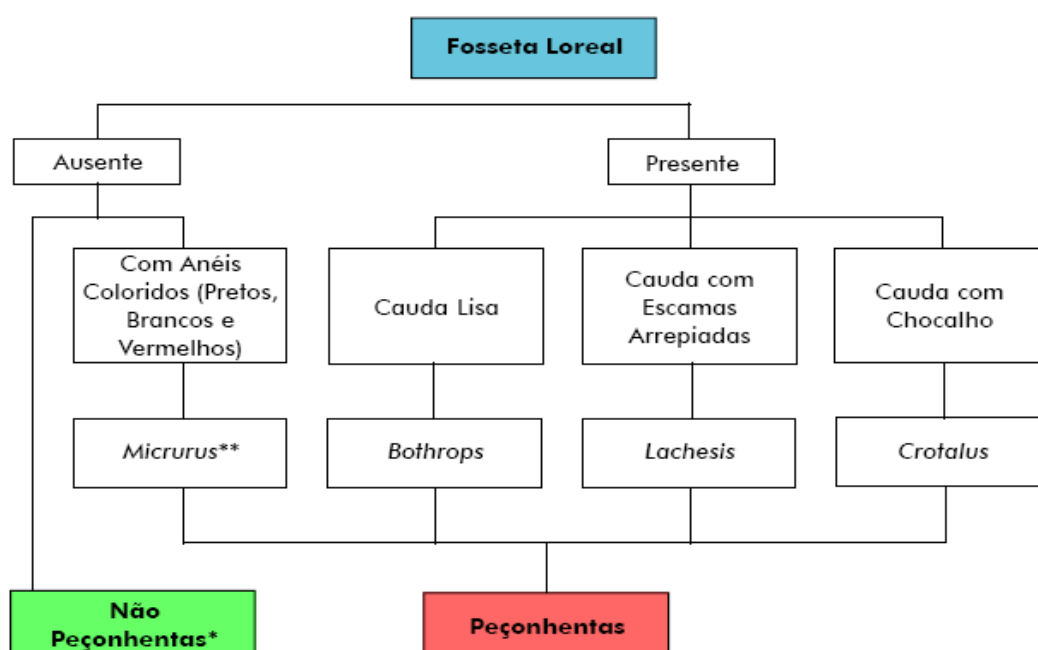
As serpentes são encontradas em quase todo o mundo, mas habitam principalmente as regiões temperadas e tropicais, em decorrência da sua dependência do calor externo para efetuar sua termorregulação, como os demais répteis, são animais ectotérmicos, diferentes de aves e mamíferos que são endotérmicos. A tolerância térmica vai de 0 a 47 graus, mas a temperatura ideal é de 25 graus, sendo que temperaturas muito discrepantes comprometem seu metabolismo (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, FUNASA; 2001; Castoe and Parkinson, 2006). Atualmente existem aproximadamente 3000 espécies distintas de serpentes (variando de diversas formas, desde o tamanho de um lápis até serpentes gigantes, ou serpentes exóticas e coloridas, até serpentes praticamente sem coloração) divididas em infra-ordem, superfamília e família, segundo classificação de McDowell(1987), citado em Cardoso et al, 2003; que divide as serpentes em duas infra-ordens, seis superfamílias e dezenove famílias.

No Brasil, já foram catalogadas mais de 260 espécies de serpentes, as quais ocorrem dentro de nove das dezenove famílias propostas por McDowell; em decorrência desta diversidade, as serpentes brasileiras são alvo de desejo de estudo por pesquisadores de diversos laboratórios nacionais e internacionais (Cardoso et al, 2003).

As serpentes podem ser classificadas em dois grandes grupos básicos: as peçonhentas, que são aquelas que conseguem inocular o seu veneno no corpo

de uma presa ou vítima, e as não peçonhentas, ambas encontradas no Brasil, nos mais diferentes tipos de habitat, inclusive em ambientes urbanos.

A fosseta loreal, órgão sensorial termorreceptor, é uma membrana rica em terminações nervosas ligadas ao cérebro, e funciona como um órgão termossensorial, permitindo a percepção de variações mínimas de temperaturas. A presença da fosseta loreal permite dizer se a serpente é peçonhenta e o tipo de cauda, o seu gênero (*Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*); entretanto as serpentes peçonhentas do gênero *Micrurus* não apresentam fosseta loreal.



* As falsas corais podem apresentar o mesmo padrão de coloração das corais verdadeiras, sendo distinguíveis pela ausência de dente inoculador.

** Na Amazônia, ocorrem corais verdadeiras desprovidas de anéis vermelhos.

Figura 01: Diferenciação das serpentes Peçonhentas e Não-Peçonhentas.
Extraído de: Ministério da Saúde, Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, FUNASA; 2001.

O Brasil possui uma riquíssima fauna de serpentes que conta com duas famílias de serpentes peçonhentas: Viperidae e Elapidae, que são classificadas quanto à dentição que apresentam como Solenóglifas e Proteróglifas, respectivamente (Manual de Diagnostico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, FUNASA; 2001; Azevedo-Marques et al, 2003; Ribeiro et al, 1995;

Silva et al, 2003; Hill et al, 2000). Estas serpentes apresentam um par de dentes especializados nos dois ossos maxilares, com os quais inoculam o veneno para matar ou imobilizar a presa e iniciar a digestão. Nas serpentes não peçonhentas as presas estão ausentes e a peçonha é utilizada apenas para auxiliar na digestão dos alimentos (Barraviera, 1999 ; Hill et al, 2000; Cardoso et al, 2003).

Os venenos das serpentes peçonhentas são produzidos em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas. As peçonhas, portanto, constituem verdadeiros arsenais químicos com potencial capaz de atrair, paralisar e matar outros organismos. Elas podem apresentar várias funções, como: ataque, captura, digestão de alimentos, ou contribuir para a defesa do animal contra predadores ou agressores. Cerca de 90% do peso seco dos venenos de serpentes são constituídos por proteínas e enzimas como *fosfolipases A₂*, *hialuronidases*, *L-aminoácido-oxidases*, *metaloproteases* e *serinoproteases*. Os demais componentes são inibidores enzimáticos, peptídeos, compostos orgânicos de baixa massa molecular, como: carboidratos e nucleotídeos, e compostos inorgânicos como: cálcio, cobalto, potássio, zinco (Matsui et al, 2000; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006). A quantidade e a qualidade da composição das peçonhas estão ligadas diretamente a diversos fatores como: a espécie, a idade, o período do ano e a alimentação (Barraviera, 1999; Cardoso et al, 2003; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006).

A família *Elapidae*, sub-família *Elapinae*, com o gênero *Micrurus*, compreende 18 espécies distribuídas por todo o Brasil. São animais de pequeno e médio porte, com tamanho de até 1 metro. São popularmente conhecidas como: Coral, Coral verdadeira ou boicorá. São caracterizados visualmente por apresentarem anéis vermelhos, pretos e brancos. O que distingue as serpentes peçonhentas das não-peçonhentas (falsas corais) deste gênero é a presença de presas inoculadoras do veneno (Barraviera, 1999; Cardoso et al, 2003). A diferenciação entre corais verdadeiras e falsas, contudo, não é fácil, em razão da dificuldade de se enxergar as presas que não são muito grandes. As estatísticas nacionais revelam a baixa incidência de acidentes por corais verdadeiras, menos que 0,5% do total (Manual de Diagnostico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, FUNASA; 2001). Estas serpentes são pouco agressivas e

geralmente picam nas mãos; os acidentes são agravados devido a neurotoxicidade dos componentes do veneno, que levam à paralisia muscular e respiratória. Estudos recentes têm demonstrado que os venenos *elapideos* também podem interferir na hemostasia (Du et al, 2006).

A Família *Viperidae*, sub-família *Crotalinae*, abrange os gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophis*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*. As serpentes do gênero *Crotalus* (cascavéis), conhecidas popularmente como cascavel, cascavel-quatro-ventos, morocombóia, maracá e outras denominações, causam cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos anuais do Brasil e apresentam o maior índice de letalidade (Manual de Diagnostico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, FUNASA; 2001). A peçonha *crotálica* é uma mistura complexa de proteínas que têm como característica principal uma discreta reação local, entretanto; os venenos *crotálicos* apresentam uma alta ação neurotóxica e hemolítica, que muitas vezes provoca a morte do acidentado quando não atendido rapidamente, o que justifica a mais alta taxa de letalidade dentre os gêneros da família *Viperidae*. A neurotoxicidade é fundamentalmente causada pela crotoxina, que é uma neurotoxina pré-sináptica que atua nas terminações nervosas motoras, inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos. Essa inibição é a principal responsável pelas paralisias motoras e respiratórias observadas nos acidentes *crotálicos* (Cardoso et al, 2003).

O Gênero *Lachesis* compreende a espécie *Lachesis muta* popularmente conhecida como surucutinga, malha-de-fogo, surucucu, surucucu-pico-de-jaca. A surucucu é a maior das serpentes peçonhentas das Américas que habita a bacia amazônica, sendo raros os acidentes causados por este gênero, e suas peçonhas apresentam atividades fisiopatológicas semelhantes às do veneno botrópico, ou seja, atividades coagulante, hemorrágica e inflamatória aguda (Cardoso et al, 2003).

Dentro do gênero *Bothrops* podemos encontrar 30 espécies distribuídas por todo o Brasil e popularmente conhecidas como: Jararaca, Jararaca-do-rabo-branco, Surucucurana, Combóia, Caiçaca, e outras denominações. Estas serpentes são as mais importantes do ponto de vista médico, já que causam 90% dos acidentes ofídicos anuais registrados no Brasil (Manual de Diagnostico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, FUNASA; 2001; Castoe and

Parkinson, 2006). O envenenamento por estas serpentes se caracteriza por efeitos proteolíticos intensos, sistêmicos e locais, como hemorragia, edema, necrose e coagulação sanguínea (Wany et al, 1998; Mazzi et al 2004; Zamunér et al, 2004; Gutiérrez et al, 2005; Castoe & Parkinson, 2006; Senis et al, 2006).

A atividade inflamatória grave é causada por um conjunto de componentes do veneno *botrópico*, bioquimicamente heterogêneos e com especificidades diversas como pequenos peptídeos e proteínas como as *fosfolipases A2*, *proteases* e enzimas diversas. Muitas frações do veneno, frequentemente apresentam atividades indiretas, induzindo a liberação de bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos e outros mediadores químicos que atuam de maneira complexa (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Cardoso et al, 2003;).

O veneno botrópico também é capaz de ativar fatores da coagulação sanguínea, ocasionando o consumo de fibrinogênio, formação de fibrina e induzindo frequentemente à incoagulabilidade sanguínea. A maioria das serpentes do gênero *Bothrops* apresenta, isolada ou simultaneamente, componentes capazes de ativar o fibrinogênio, a protombina e outros fatores da cascata de coagulação, sobretudo FII e FX (Gasmi et al, 2000; Matsui et al, 2000; Du, et al, 2006; Senis et al, 2006;). A atividade hemorrágica, outra característica de importância nos acidentes botrópicos, é atribuída às hemorraginas, que são metaloproteinases zinco - dependentes. Estas toxinas podem romper a integridade do endotélio vascular, apresentar atividade desintegrina e degradar vários componentes da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e laminina, além de serem potentes inibidores da agregação plaquetária (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Matsui et al, 2000; Rodrigues et al, 2001; Gay et al, 2005; Wang et al, 2005; Gutiérrez et al, 2006; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006).

Dentre os diversos componentes dos venenos de serpentes da família Viperidae, destacam-se as enzimas proteolíticas: metaloproteinases (SVMP's) e as enzimas fibrin(ogen)olíticas. Estas proteases têm sido alvos de estudos e de interesses particulares, pois estão diretamente relacionadas com as diversas patologias do envenenamento como: hemorragia, edema, inflamação, necrose e desordens relacionadas com o processo da hemostasia. (Bjarnasson and Fox, 1994; Markland, 1998; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Matsui et al, 2000; Fox & Serrano, 2005; Stroka et al, 2005; Swenson and Markland, 2005; Gutiérrez et al,

2005; Castoe & Parkinson, 2006). Segundo citação de Ramos & Selistre-de-Araujo (2006), recentes estudos têm revelado que as fosfolipases A_2 são quantitativamente mais representativas nos venenos das serpentes da família Viperidae, enquanto as metaloproteinases apresentam maior variabilidade (Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002; Juarez et al, 2004; Serrano et al, 2005).

As metaloproteinases compreendem um amplo grupo de proteínas da família zinco dependente “metzincin”, que juntamente com as proteínas ADAMs (proteínas reprodutivas de mamíferos), pertencem à subfamília “*reprolysins*”, já que elas apresentam uma organização estrutural de domínios semelhantes (Bjarnoson and Fox, 1995; Jia et al, 1996; Matsui et al, 2000; Fox & Serrano, 2005; Wang et al, 2005) Estas enzimas apresentam uma grande região padrão conservada (**HEBXHXBGBXH**) ligada a zinco, onde **H** é uma histidina, **E** um ácido glutâmico, **G** uma glicina, **B** um resíduo hidrofóbico e **X** qualquer aminoácido (Markland, 1998).

A maioria das metaloproteinases é tanto fibrinogenolítica quanto fibrinolítica. São enzimas sintetizadas e armazenadas nas glândulas do veneno na forma de zimogênio que é inibido por um mecanismo denominado “*cysteine-switch*”, em que o grupo tiol de um resíduo de cisteína da seqüência **PKMCGVT**, localizado no pró-domínio da metaloproteinase, é capaz de inibir a atividade catalítica da pró-enzima, bloqueando seu sitio ativo por se ligar ao íon zinco. Após serem secretadas, essas enzimas sofrem um processamento proteolítico que converte o zimogênio na forma ativa da enzima (Grams et al, 1993; Wang et al, 2005; Ramos & Selistre-deAraujo, 2006)

Os primeiros dados sobre as seqüências das metaloproteinases surgiram nos anos 70, seguidos do sequenciamento por cDNA nos anos 90, com estes resultados permitiu-se a classificação das metaloproteinases de acordo com sua organização multidomínios nas classes PI, PII, PIII e PIV (Fox & Serrano, 2005; Wang et al, 2005), como apresentado na Figura 2.

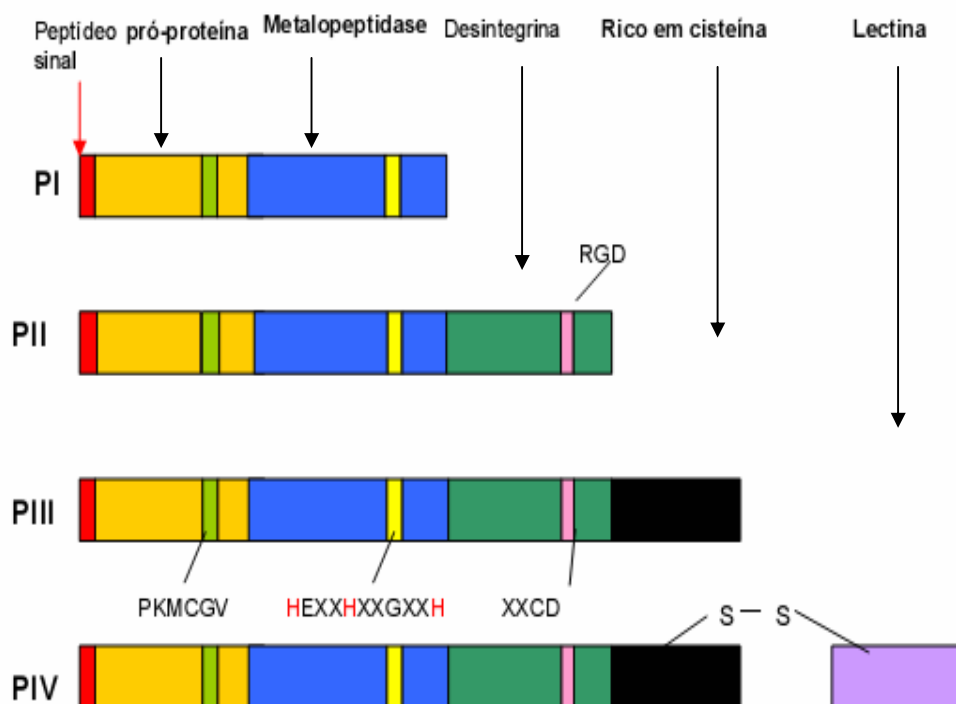


Figura 02: Diagrama esquemático da divisão das metaloproteínases de venenos de serpentes, conforme a composição estrutural das enzimas. Extraído de Bjarnason & Fox, 1994.

Esta classificação foi inicialmente proposta por Bjarnason & Fox em 1994. As enzimas da classe P-I são de baixa massa molar entre 20-30 kDa e com fraca ou nenhuma atividade hemorrágica, dentre elas podemos citar a *Atrolysin C* (Shonnon et al, 1989), *Fibrolase* (Markland, 1996), *moojeni protease A* (Assakura et al, 1985; Reichl & Mandelbaum, 1992), *Neuwidase* (Rodrigues et al, 2000) e recentemente encontramos o relato da purificação da enzima *Leuc-a* de *Bothrops leucurus* (Bello et al, 2006) e *Cotiaractivase* de *Bothrops Cotiara* (Senis et al, 2006). Na classe P-II encontramos as metaloproteínases com massa molecular entre 30-60 kDa que possuem um domínio semelhante a desintegrina (disintegrin-like) na região carboxi-terminal (Fox & Serrano, 2005; Jia et al, 1996; Lou et al, 2005), dentre alguns membros da classe P-II podemos citar *Atrolysin E* (Hite et al, 1992). Na classe P-III encontramos as mais potentes toxinas hemorrágicas que apresentam o domínio metaloproteínase, o desintegrina e um terceiro domínio rico

em cisteína na região carboxi-terminal. As toxinas desta classe têm massa molecular entre 60-80 kDa, dentre elas citamos *Atrolysin A* (Fox & Bjarnason, 1995) e *Jararagina* (Paine et al, 1992). A classe P-IV é composta por enzimas que possuem entre 80-100 kDa de massa molecular e apresentam duas subunidades; uma constituída pelos mesmos domínios da classe P-III e outra por domínio semelhante a lectina (*Lectin-like*), conectados por ligações dissulfeto. Dentre algumas citamos *LHF-I* (Sanchez et al, 1987) e *VLFXA* (Siigur et al, 2001).

Recentemente Fox & Serrano (2005), atualizaram a classificação das metaloproteínases incluindo as seguintes subclasses: P-IIa, cuja forma não libera o domínio desintegrina; P-IIb cuja forma nativa compreende as metaloproteínases dimericas; P-IIIa que revelam seus domínios desintegrina ricos em cisteínas e P-IIIb que formam metaloproteínases dimericas, como mostrado na Figura 3.

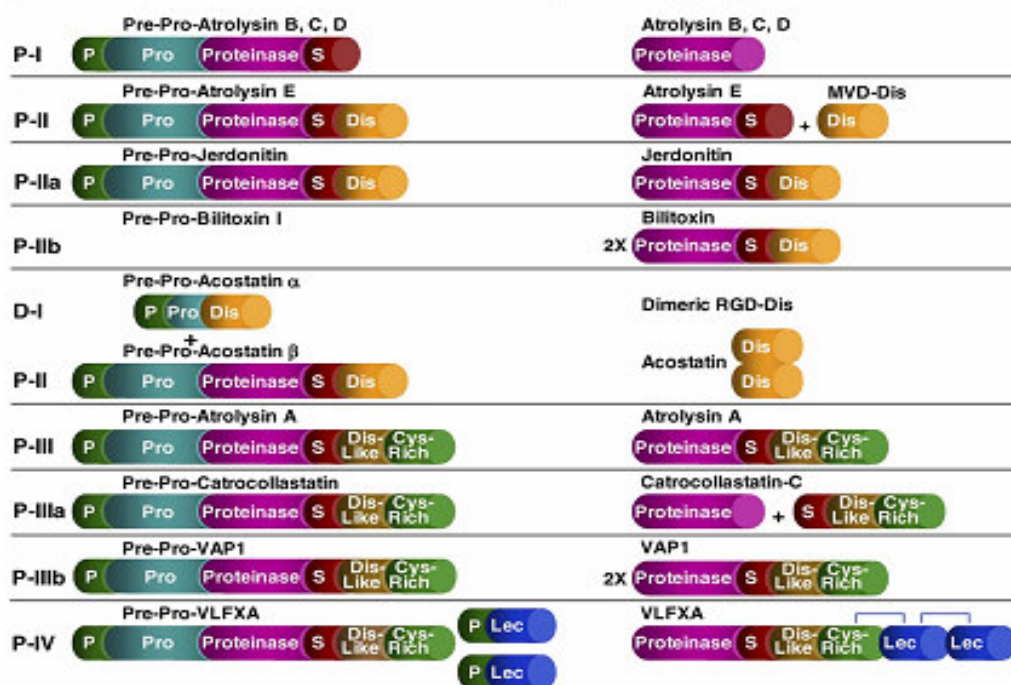


Figura 03: Diagrama esquemático da divisão das metaloproteínases de venenos de serpentes, com modificações propostas por Fox & Serrano (2005). P= peptídeo sinal; Pro= pró-proteína; S= HEBXHXBGXBH; Dis= desintegrina; Dis-like= semelhante a desintegrina; Cys-rich= rico em cisteína; Lec= lectina.

As enzimas fibrin(ogen)olíticas são comuns nos venenos de serpentes das famílias *Viperidae*, *Elapidae* e *Crotalidae*. Estas proteases com especificidade sobre a cadeia A α e B β do fibrinogênio são observadas como possíveis agentes terapêuticos a ser aplicado no tratamento da trombose e distúrbios relacionados com a coagulação sanguínea. Desde a década de 50 que encontramos relatos consistentes sobre as possíveis utilizações destas enzimas como agentes terapêuticos; dentre as vantagens relatadas para o uso clínico destas enzimas, podemos citar que elas não ativam o plasminogênio, evitando efeitos colaterais como a ativação plaquetária; e não são inibidas por inibidores de proteases do sangue (SERPINS). Em geral, apresentam ausência de alterações patológicas e histopatológicas significativas (Gutierrez & Rucavado, 2000; Matsui et al, 2000; Gay et al, 2005; Jin et al, 2005; Lou et al, 2005; Swenson & Markland, 2005; Du et al, 2006; Senis et al, 2006).

Das 67 enzimas fibrin(ogen)olíticas relatadas, 46 são metaloproteinases pertencentes à família “metzincin”. As α - *fibrinogenases* são enzimas que degradam preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio, sendo capazes de degradar também a cadeia B β e não interferem com a cadeia γ ; assim como a *Neuwiedase* isolada da peçonha de *Bothrops neuwiedi*, que apresenta 198 resíduos de aminoácidos com uma massa molar de 22,5 kDa, pI = 5,9, pH ótimo de ação entre 7,4 - 8,0, temperatura ótima de 37°C e é inibida por EDTA e 1,10-fenantrolina (Rodrigues et al, 2000).

Já as proteases que degradam preferencialmente a cadeia B β e apresentam menor especificidade sobre a cadeia A α do fibrinogênio, são geralmente chamadas de serinoproteases. Elas possuem a capacidade de interferir em pontos distintos da coagulação sanguínea causando desordem no sistema hemostático, e são freqüentemente referidas como enzimas *thrombin-like* por possuírem a habilidade de clivar o fibrinogênio de forma semelhante à trombina (Matsui et al, 2000).

As fibrinogenases da peçonha de serpentes que possuem a habilidade de hidrolisar preferencialmente a cadeia γ do fibrinogênio, são bastante raras, existe relato deste tipo de protease purificada da peçonha de *Crotalus atrox* (toxina hemorrágica) com peso molecular de 64 kDa (Nikai et al, 1984).

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral fracionar a peçonha de *Bothrops moojeni*(Caiçaca), buscando purificar e caracterizar bioquimicamente uma enzima proteolítica.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar uma proteinase da peçonha de *Bothrops moojeni*
- Determinar suas principais características químicas como: peso molecular aproximado, grau de pureza da amostra, ponto isoelétrico e a seqüência de aminoácidos da região N-terminal da enzima isolada.
- Determinar suas principais características catalíticas, como: atividade proteolítica frente a diferentes substratos naturais ou não, efeito de inibidores, íons metálicos, pH e temperatura.
- Determinar suas principais atividades biológicas, como: incoagulabilidade sangüínea, edema e mionecrose.
- Com base nas características obtidas, classificá-la como metaloproteinase ou serinoproteinase.

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSAKURA, M. T., REICHL, A. P., ASPERTI, M. C. A., MANDELBAUM, F. R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (Caissaca). *Toxicon* 23, 691-706, 1985.

AZEVEDO-MARQUES, M. M., CUPO, P., HERING, S. E., Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes Peçonhentas, *Simpósio: Urgências e Emergências Dermatológicas e Toxicológicas: Medicina*, Ribeirão Preto, 36: 480-489, abr/dez 2003.

BARRAVIERA, B. VENENOS, Aspectos Clínicos e Terapêuticos dos Acidentes por Animais Peçonhentos, *Editora de publicações biomédicas Ltda*, 1º Ed; 1999. 411 p.

BELLO, C. A., HERMÓGENES, A. L. N., MAGALHÃES, 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* 88, 189-200, 2006.

BJARNASSON, J. B., FOX, J. W., Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, *Pharmacol* 62, 325-372, 1994.

BJARNASON, J. B., FOX, J. W., Snake venom metalloproteinases: *reprolysins*. *Methods Enzymol* 248, 345-368, 1995.

BOCHENER, R., STRUCHINER, C. I., Snakebite epidemiology in the last 100 years in Brazil, *A Review Cad Saude Pública*, 19, 7-16, 2003.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. MINISTÉRIO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Diagnostico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, *FUNASA*, 3ª edição, 112 p 2001.

CARDOSO, J. L. C., FRANÇA, F. O., WEN, F. H., MÁLAQUE, C. M., HADDAD JR., Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo – Ed. Sarvier/FAPESP. 1ª edição, 459 p 2003.

CASTOE, T. A., PARKINSON, C. L., Bayesian mixed models and the phylogeny of pipvipers (*Viperidae*: Serpentes), *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39 91-110, 2006.

CHEN, R. Q., JIN, Y., WU, J. B., ZHOU, X. D., LU, Q. M., WANG, W. Y., XIONG, Y. L. A new protein structure of P-II class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains. *Biochem Biophys Res.* 310,182-187, 2003.

DU, XIAO-YAN, SIM, D. S., LEE, WEN-HUI, ZHANGY, Y., Blood cells as targets of snake toxins, *Bolld Cells, Molecules and Diseases* 36, 414-421, 2006.

FOX, J. W., BJARNASON, J. B., *Atrolysins*: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. *Methods Enzymol.* 248, 368-387, 1995.

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

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

GASMI, A., SRAIRI, N., KAROUI H., EL, M., Amino acid sequence of VIF: identification in the C-terminal residues common to non-hemorrhagic metalloproteinases of venom snake, *Biochimica et Biophysica acta* 1481, 209-212, 2000.

GRAMS, F., HUBER, R., KRESS, L. F., Activation of snake venom metalloproteinases by a cyteine switch-like mechanism. *FEBS Lett* 335, 76-80, 1993.

GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R., Most cited papers in Toxicon. *Toxicon* 44, Issue 4, p. 345-359, 2004.

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

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

GUTIÉRREZ, J. M., NÚÑEZ J., ESCALANTE T., RUCAVADO A., Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake hemorrhagic metalloproteinases, *Microvascular Research* 71, 55-63, 2006.

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

HITE, L. A., SHANNON, J. D., BJARNASON, J. B., FOX, J. W. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*; evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. *Biochemistry* 31, 6203-6211, 1992.

JIA, LI-GUO, SHIMOKAWA, KEN-ICHI, BJARNASON, J. B., FOX, J. W., Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins, *Toxicon* 34, 1269-1276, 1996.

JUAREZ, P., SANZ, L., CALVETE, J. J., Snake venomomics: characterization of protein families in Sistrurus barbouri venom by cysteine mapping. N-terminal

sequencing and tandem mass spectrometry analysis. *Proteomics* 4, 327-338, 2004.

JUNQUEIRA-DE-ARAUJO, I. L., HO, P. L., A Survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Genes* 299, 279-291, 2002.

LOU, Z., HOU, J., LIANG, X., CHEN, J., QIU, P., LIU, Y., LI, M., RAO, Z., YAN, G., Crystal structure of a non-hemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloproteinase complexed with a novel natural tri-peptide inhibitor from venom of *Agkistrodon acutus*. *Journal of Structural Biology* 152, 195-203, 2005.

MARKLAND, F. S., *Fibrolase*, an active thrombolytic enzyme in arterial and venous thrombosis model systems. *Adv Exp Med Biol* 391, 427-438, 1996.

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

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TATANI, K., Review: Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis, *Biochimica et Biophysica acta* 1477, 146-156, 2000.

MAZZI, M. V., MARCUSSI S., CARLOS, G. B., STÁBELI, R. G., FRANCO, J. J., TICLI, F. K., CINTRA, A. C. O., FRANÇA, S. C., SOARES, A. M., SAMPAIO, S. V., A New hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization, *Toxicon* 44, 215-223, 2004.

NIKAI, T., MORI, N., KISHIDA, M., SUGIHARA, H., TU, A. T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. *Biochimica et Biophysica acta* 321, 231-309, 1984.

PAINE, M. J., DESMOND, H. P., THEAKSTON, R. D., CRAMPTON, J. M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararahagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *J Biol Chem* 32, 22869-22876, 1992.

RAMOS, O. H. P., SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Review: Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains, *Comparative Biochemistry and Physiology*, part C 142, 328-346, 2006.

REICHL, A. P., MANDELBAUM, F. R., Proteolytic specificity of *moojeni* protease A isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. *Toxicon* 31, 187-194, 1993.

RIBEIRO, L. A., JORGE, M. T., IVERSSON, L. B., Epidemiologia do acidente por serpentes peçonhentas: Estudo de casos atendidos em 1988, *Rev de Saúde Publica* 29(5), 1995.

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

RODRIGUES, V. M., SOARES, A. M., ANDRIÃO-ESCARSO, S. H., FRANCESCHI A. M., RUCAVADO, A., GUTIÉRREZ, J. M., GIGLIO, J. R. Pathological alterations induced by *neuweidase*, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom, *Biochimie* 83, 471-479, 2001.

SANCHEZ, E. F., MAGALHÃES, A., DINIZ, C. R. Purification of a hemorrhagic factor (*LFH-I*) from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. *Toxicon* 25, 611-619, 1987

SENIS, Y. A., KIM, P. Y., FULLER G. L. J., GARCÍA, A., PRABHAKAR, S., WILKINSON, M. C., BRITTAN, H., ZITZMANN, N., WAIT, R., WARRELL, D. A., WATSON, S. P., KAMIGUTI, A. S., THEAKSTON, D. G., NESHEIM, M. E., LAING,

G. D., Isolation and characterization of *cotiaractivase*, a novel low molecular weight prothrombin activator from the venom of *Bothrops cotiara*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1764; 863-871, 2006.

SERRANO, S. M. T., SHANNON, J. D., WANG, D., CMARGO, A. C. M., FOX, J. W., A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. *Proteomics* 5, 501-510, 2005.

SHANNON, J. D., BARAMOVA, E. N., BJARNASON, J. B., FOX, J. W., Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. *J Biol Chem* 264 (20), 11575-11583, 1989.

SIIGUR, E., TONISMAGI, K., TRUMMAL, K., SAMEL, M., VIJA, H., SUBBI, J., SIIGUR, J., Fator X activator from viper *lebetina* snake, molecular characterization and substrate specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1568(1), 90-98, 2001.

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

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

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

ZAMUNÉR, S. R., CRUZ-HOFLING, M. A., CORRADO, A. P., HYSLOP, S., RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of *Brazilian Bothrops* venoms and neutralization by commercial antivenom, *Toxicon* 44, 259-271, 2004.

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

WANY S. M., MARCIA O. C., JOSÉ O. C., DAVID T. V., CHAVEZ-OLAOTEGUI, C., Neutralizing potency of horse antithrombotic antivenom. Correlation between in vivo and in vitro methods, *Toxicon* 36 (10), 1433-1439, 1998.

4- CAPÍTULO ÚNICO

BthMP: UMA NOVA

METALOPROTEINASE DO VENENO

DE Bothrops moojeni(Caiçaca)

- Este capítulo foi escrito de acordo com as normas técnicas de publicação exigidas pela revista *Bioorganic Chemistry* .

RESUMO

Neste trabalho uma nova metaloproteinase (BthMP) foi purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni*. A protease é homogênea em PAGE-SDS e nativa, apresentou uma única cadeia polipeptídica de 23,5 kDa, pI = 7,1 e N-terminal bloqueado. BthMP é provida de alta atividade proteolítica sobre a caseína, fibrina e fibrinogênio bovino; foi inibida por EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina e manteve sua atividade em pH de 7,0 a 9,0 e temperatura de 5 a 40°C. Ensaio com íons metálicos mostraram que Ca^{++} é ativador, enquanto Zn^{++} e Hg^{++} inibiram cerca de 50 e 80%, respectivamente. BthMP é desprovida de atividades coagulante, esterásica, fosfolipásica e fracamente hemorrágica quando comparada ao veneno bruto. O edema induzido pela metaloprotease evidenciou o importante papel da toxina na atividade inflamatória do veneno. BthMP também causou incoagulabilidade sanguínea, e provocou alterações histológicas em músculo gastrocnêmio de camundongos induzindo hemorragia, necrose e infiltrado leucocitário. A massa molecular e os ensaios de inibição com EDTA e 1,10-fenantrolina sugerem que a metaloproteinase BthMP pertence à classe P-I das SVMPs.

Palavras - chave: *Bothrops moojeni*; metaloproteinases; veneno; serpentes.

ABSTRACT

In this work a new metalloproteinase (BthMP) was purified from the snake venom of *Bothrops moojeni*. This enzyme was homogeneous by native and SDS-PAGE it showed polypeptide chain of 23,5 kDa, pI = 7,1 and N-terminal blocked. BthMP is comprised of high proteolytic activity on casein, fibrin and bovine fibrinogen, but no coagulating, esterase, phospholipase A₂ activities, and lightly hemorrhagic; it was inhibited by EDTA, EGTA and 1,10-phenanthroline and maintained its activity on pH of 7,0 at 9,0 and temperature of 5 to 40°C. Assays with metal ions showed that Ca⁺⁺ is an activator, whereas Zn⁺⁺ and Hg⁺⁺ inhibited about 50 and 80%, respectively. The edema evidenced the important role of the toxin in the inflammatory activity of the venom. BthMP also caused unclogging, and provoked histological alterations in gastrocnemius muscle of mice inducing hemorrhage, necrosis and leucocytic infiltrate. The molecular mass and the inhibition assays suggest that the metalloproteinase BthMP belongs to class P-I SVMPs.

Keywords: *Bothrops moojeni*; *Metalloproteinase*; *Snake*; *Venom*.

5- INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes constituem-se de um verdadeiro arsenal químico, contendo uma variedade de proteínas e peptídeos biologicamente ativos, que contribuem para os efeitos locais e sistêmicos ocorridos após o envenenamento. Entre os diversos componentes dos venenos de serpentes, destacam-se as metaloproteinases (SVMP's) e as enzimas fibrin(ogen)olíticas. Essas proteases têm sido alvo de estudo, tendo em vista que estão diretamente relacionadas com diversas patologias, tais como: hemorragia, edema, inflamação, necrose e desordens no sistema hemostático. As metaloproteinases compreendem um amplo grupo de proteínas da família zinco dependente “metzincin”, juntamente com as proteínas ADAMs (proteínas reprodutivas de mamíferos). Elas pertencem à subfamília “*reprolysins*”, já que apresentam uma organização estrutural de domínios semelhantes [1, 2]. Esta família compreende metaloproteinases zinco dependentes, que apresentam uma grande região padrão conservada (**HEBXHXBGBXH**) ligada a zinco, onde **H** é uma histidina, **E** um ácido glutâmico, **G** uma glicina, **B** um resíduo hidrofóbico e **X** qualquer aminoácido. A maioria das metaloproteinases é tanto fibrinogenolítica quanto fibrinolítica. São enzimas sintetizadas e armazenadas nas glândulas do veneno na forma de zimogênio, o qual é inibido por um mecanismo denominado “*cysteine-switch*”, em que o grupo tiol de um resíduo de cisteína da sequência **PKMCGVT**, localizado no pró-domínio da metaloproteinase, é capaz de inibir a atividade catalítica da pró-enzima, bloqueando seu sítio ativo por se ligar ao íon zinco. Após serem secretadas, essas enzimas sofrem um processamento proteolítico que converte o zimogênio na forma ativa da enzima [2, 3, 4].

As metaloproteinases são classificadas de acordo com sua organização multidomínios nas classes PI, PII, PIII e PVI [1, 2, 4, 5, 6]. Segundo esta classificação, a classe P-I constitui-se de enzimas com apenas um domínio metaloproteinase. A classe P-II constitui-se de enzimas com um domínio metaloproteinase e um domínio Desintegrin-like (*Dis-like*). Na classe P-III, encontramos as enzimas sintetizadas com o domínio metaloproteinases, um domínio semelhante à desintegrina (*Dis-like*) e um domínio rico em cisteína (*Cys-rich*). Estas têm a característica de apresentarem alto potencial hemorrágico. A classe P-IV compõe-se de enzimas com duas subunidades: uma constituída pelos mesmos domínios da classe P-III e outra por domínio semelhante a lectina (*Lectin-like*), conectados por ligações dissulfetos. Recentemente Fox & Serrano [1], atualizaram a classificação das metaloproteinases incluindo as seguintes subclasses: P-IIa, cuja forma não libera o domínio desintegrina; P-IIb cuja forma nativa compreende as metaloproteinases diméricas; P-IIIa que revela seus domínios desintegrinas e rico em cisteínas e P-IIIb que forma metaloproteinases diméricas.

As espécies do gênero *Bothrops* (família Viperidae) são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos ocorridos na América Latina e principalmente no Brasil [7, 8, 9]. Os venenos desta espécie são caracterizados por conterem uma diversidade de enzimas proteolíticas atuando sobre vários substratos como: Fibrinogênio, Fibrina, Colágeno, Insulina, entre outros [9, 10, 11, 12]. Desse gênero, que tem se revelado de grande importância clínica, muitas toxinas têm sido isoladas e caracterizadas de várias espécies, tais como: *Bothrops asper* [13, 14], *Bothrops neuwiedi* [10], *Bothrops cotiara* [15], *Bothrops Pirajai* [16], *Bothrops Jararacussu* [17, 18], *Bothrops jararaca* [19], *Bothrops moojeni* [20, 21, 22]. Neste

trabalho nós relatamos uma nova metaloproteinase fibrin(ogen)olítica do veneno de *Bothrops moojeni*.

6-MATERIAIS E MÉTODOS

6.1) Obtenção da peçonha de *Bothrops moojeni* e dos animais.

A peçonha de *Bothrops moojeni* foi cedida pela *Pentapharm* do Brasil, sendo posteriormente liofilizada e armazenada a -20°C no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais (INGEB/UFU).

Os camundongos Swiss foram gentilmente cedidos pelo Instituto Vallé e pela *Pentapharm* do Brasil, sendo mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) do INGB/UFU.

6.2) Resinas e Reagentes Utilizados em Cromatografia, Eletroforese, Ensaio Enzimáticos e Biológicos.

Resinas de DEAE-Sephacel, Sephadex G-75 da Amersham Biosciences.

Acrilamida, Bis-acrilamida, TEMED, SDS, Coomassie brilliant blue R-250, Soroalbumina bovina, Fucsina básica, Persulfato de amônio, Bicarbonato de amônio, Tris, Glicina, Azul de bromofenol, EDTA, EGTA, Aprotinina, Leupetina, β -mercaptoetanol, 1,10-fenantroline, Fibrinogênio bovino, Trombina, Caseína bovina, Padrão de peso molecular (Dalton Mark VII-L), produtos da Sigma Chem. Co.

Plasma Bovino obtido junto ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Todos os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

6.3) Fracionamento da Peçonha de *Bothrops moojeni* e obtenção de *BthMP*.

A purificação da metaloproteinase foi realizada com aproximadamente 200mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* os quais foram suspensos em 2,0ml de tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7.8. Em seguida a mistura foi

centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos a 4⁰C e o sobrenadante aplicado a uma coluna de troca iônica contendo a resina DEAE-Sephacel (1,4 x 10,5 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída a temperatura ambiente pelo estabelecimento de um gradiente convexo de concentração usando o tampão AMBIC 0,05 a 0,50 M pH 7,80, sendo este gradiente estabelecido a partir do tubo de número 60. Foram coletadas frações de 1,5 mL/tubo num fluxo de 15 mL/hora, em um coletor de frações RediFrac (Amersham Biotec). A absorbância de cada fração coletada foi lida a 280nm num espectrofotômetro Ultrospec 1000UV/Visível (Pharmacia Biotech).

A fração D2 obtida neste fracionamento foi liofilizada em um liofilizador Labconco (LYPH-LOCK IL), ressuspensa em 1 mL de tampão AMBIC 0,05 M, pH 7,8 e centrifugado a 10000 x g por 10 minutos, a 4^o C. O sobrenadante foi aplicado em coluna Sephadex G-75 (0,9 x 80 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão e todo o procedimento cromatográfico foi realizado conforme descrito para o fracionamento anterior.

6.4) Determinação quantitativa de proteínas

As dosagens de proteínas em soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg/ 2,0mL foram realizadas pelo método do microbiureto, conforme descrito por *Itzhaki e Gill* [23]. A reta padrão foi construída com soroalbumina bovina, considerando-se o seu coeficiente de extinção molar em 280 nm (0,665).

6.5) Características Químicas

6.5.1) Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (PAGE-SDS).

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes (SDS) foram realizadas conforme a técnica descrita por *Laemmli* [24].

O tampão do eletrodo continha Tris 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1% (m/v), pH 8.3. As amostras foram dissolvidas em tampão da amostra (Tris-HCl 0,06M pH 6.8, azul de bromofenol 0,001% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 10% (v/v)). As eletroforeses foram realizadas em sistema de eletroforese *Hoefer SE260 Mighty Small Mini Vertical*. Após a corrida os géis foram corados em uma solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% (m/v) em água e metanol na proporção de 1:1 (v/v) e descorados numa solução de ácido acético a 7%. O peso molecular aproximado foi estimado pelo padrão de peso molecular *Dalton Mark VII-L* (Sigma), contendo as seguintes proteínas: *Soroalbumina bovina* (66kDa), *Ovoalbumina* (45kDa), *Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase* (36kDa), *Anidrase Carbônica* (29kDa), *Tripsinogênio* (24kDa), *Inibidor de tripsina* (20.1kDa), α -*lactoalbumina* (14.4kDa).

6.5.2) Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas para proteínas básicas.

A eletroforese foi realizada de acordo com *Reisfeld* [25], com modificações. Na preparação dos géis a 10% foram utilizadas as seguintes soluções: solução A

(KOH 1M, pH 4,5), Solução C (*Acrilamida: bis-acrilamida* 30:0,2 m/m), *TEMED*, *Persulfato de amônio* (20mg/2mL).

O tampão do eletrodo continha β -alanina e ácido acético a 0,35M pH 4,5 (solução estoque), sendo diluído 10 vezes no momento do uso. Foi realizada uma pré-corrida no gel de aproximadamente 30 minutos.

A amostra contendo cerca de 10 μ g de proteína foi dissolvida em aproximadamente 10 μ L do tampão do eletrodo e acrescentado 1 μ L de glicerol. A fucsina básica foi utilizada como marcador de migração. A eletroforese foi conduzida a 25mA de corrente, por aproximadamente 35 minutos. Após a eletroforese o gel foi corado em uma solução de *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,1% (m/v) contendo água e metanol na proporção de 1:1 (v/v) e descorado numa solução de ácido acético a 7%.

6.5.3) Focalização Isoelétrica.

A eletrofocalização da metaloproteinase denominada *BthMP* foi realizada segundo o método descrito por *Vestberg* [26].

6.5.4) Determinação da seqüência N-terminal.

A análise da seqüência N-terminal da metaloproteinase *BthMP* foi realizada em um seqüenciador automático de proteínas da *Shimadzu* (modelo PPSQ-23A). Inicialmente uma amostra de aproximadamente 90 μ g da proteína foi transferida para um gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE), como descrito no item 6.4.1, Após corrida do gel, a banda principal foi transferida para

uma membrana (PVDF), e uma amostra extraída e aplicada em um seqüenciador automático de proteínas da *Shimadzu* (modelo PPSQ-23A).

6.6) Caracterização Enzimática

6.6.1) Atividade de degradação do Fibrinogênio.

Este ensaio foi realizado segundo o método descrito por *Oliveira et al* [21], onde amostras contendo 10µg de proteínas foram incubadas a 37°C por 5 a 60 minutos com 50µL de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL) dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,80. O término da reação ocorreu após a adição do tampão da amostra de eletroforese: Tris-HCl 0,06M pH 6,8; SDS 2% (m/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); azul de bromofenol 0,005% (m/v) e glicerol 10% (v/v). Em seguida as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 100°C, e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agente desnaturante (SDS).

A ação dos inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica de *BthMP* foi realizada pré-incubando 10µg de proteínas com β-mercaptoetanol, EDTA, Aprotinina, 1,10-fenantrolina e leupeptina todos a concentração 10mM, em seguida foi realizada a atividade proteolítica como descrito acima.

6.6.2) Estabilidade da Metaloproteinase *BthMP* frente ao pH e a Temperatura.

Cerca de 5µg da metaloproteinase *BthMP* foram dissolvidos em um volume de 10µL de salina e pré-incubados por 60 minutos em diferentes pHs (3 a 9) em temperatura ambiente; e a mesma massa da metaloproteinase também foi pré-incubada em diferentes temperaturas (5 a 90 °C) por 30 minutos em pH neutro.

Em seguida foi realizada a atividade fibrinogenolítica conforme descrito no item 6.6.1.

6.6.3) Atividade Fibrinolítica.

A atividade proteolítica sobre a fibrina foi realizada segundo o método descrito por *Astrup and Mullenztz* [27], com algumas modificações. Utilizando solução de fibrinogênio bovino a 0,2% em tampão fosfato 5mM contendo NaCl 0,15M, pH 7,4. Esta solução foi colocada em placa de petri juntamente com trombina bovina (100U/mL) diluída no mesmo tampão e a mistura incubada por 1 hora em temperatura ambiente para ocorrer a formação do coágulo de fibrina. A seguir, diferentes concentrações da metaloproteinase *BthMP* e da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foram aplicados na placa e incubados a 37°C por 24 horas. A seguir, os halos de lise foram medidos com um paquímetro digital *DIGMESS* 100.174BL.

6.6.4) Atividade Coagulante sobre o Plasma Bovino.

A atividade coagulante da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e da metaloproteinase *BthMP* foi realizada segundo *Assakura et al* [28], utilizando 100µL de plasma bovino como substrato da reação com 10µg de amostra. Este experimento foi realizado em um aparelho coagulômetro *Quick-Timer* (DRAKE Ltda) que determina o tempo de coagulação da amostra até um máximo de 120 segundos, por um sistema óptico que detecta a vibração brusca da densidade da amostra no instante da coagulação, devido à formação dos primeiros coágulos de fibrina.

6.6.5) Atividade esterásica sobre o TAME.

A atividade esterásica foi determinada sobre o TAME (*N-p-Tolueno-sulfonil Arginina Metil Éster*) como descrito por *Hummel* [29]. Como substrato foi utilizado uma solução de TAME 1,04 mM em Tris-HCl 0,02M e CaCl₂ 0,15M, pH 8,1.

Amostras contendo 15µg de proteínas foram adicionadas e a quantificação da atividade foi realizada por análise espectrofométrica a 244 nm/minuto durante 10 minutos de reação. Uma unidade de atividade foi determinada como o acréscimo de 0,001 Abs_{244nm}/min.

6.6.6) Atividade Hemolítica indireta (Fosfolipase A₂).

A atividade fosfolipases indireta foi avaliada por meio da hemólise causada pelas amostras, em eritrócitos de camundongos suplementados com gema de ovo no gel de agarose como previamente descrito *Gutiérrez et al* [30]. Para preparação do gel, extraiu-se sangue de camundongos previamente anestesiados com éter de petróleo e os eritrócitos foram lavados por 3x com PBS. Para cada gel foram adicionados 0,25g de agarose em 25ml de PBS e esta mistura foi dissolvida por aquecimento. Posteriormente foi adicionado 0,005g de azida, 0,25g de CaCl₂ a 0.01M, 0,3ml de gema de ovo e 0,3ml dos eritrócitos lavados. Alíquotas de 20µl de solução de salina contendo de 5 a 30µg da metaloproteinase *BthMP* ou 10 a 20µg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*, foram aplicadas em poços de aproximadamente 4mm de diâmetro feitos no gel em placa de petri. Os géis foram incubados a 37°C por 24 horas e a formação do halo hemolítico medido.

6.6.7) Atividade Caseinolítica por Espectrofotometria.

A atividade caseinolítica foi realizada segundo o método de *Van Der Walt and Joubert* [31], com modificações, utilizando-se como substrato solução de caseína a 1% (p/v) em Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. 750µL da solução de caseína foram misturados com 10µg da amostra dissolvida em 250µL de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e incubada por 15 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com a adição de 1500µL de TCA a 5% (v/v) e deixada em repouso na temperatura ambiente por 30 minutos, o sobrenadante foi retirado, centrifugado por 10.000 x g durante 10 minutos e a atividade medida em 280nm num espectrofotômetro Ultrospec 1000UV/Visível (Pharmacia Biotech). Uma unidade de atividade caseinolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001 unidade/minuto nas condições experimentais descritas acima.

A atividade caseinolítica da metaloproteinase *BthMP* também foi determinada na presença de íons metálicos: Mg⁺⁺, Hg⁺⁺, Zn⁺⁺, Ba⁺⁺ e Ca⁺⁺, por pré incubação de 10µL de cada solução iônica a 10mM com 10µg da metaloproteinase *BthMP* por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi determinada a atividade caseinolítica como já descrito. A presença de agentes quelantes (EDTA e EGTA 10mM) e de alguns inibidores de proteases (Benzamidina, β-mercaptoetanol, Aprotinina e Leupeptina, todos a 10mM) também foi avaliada pelo mesmo procedimento.

Todos estes ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média (n=3).

6.7) Atividades Biológicas

6.7.1) Atividade Hemorrágica.

Foi realizada como descrito por *Nikai et al* [32]. Foram utilizados camundongos Swiss machos de 20-25g divididos em grupos (n=5). Os animais controle receberam injeção intradérmica de 50µL de PBS e os outros grupos receberam de 10 a 30µg da peçonha de *Bothrops moojeni* ou 20µg e 30µg da metaloproteinase *BthMP*, dissolvidos em 50µL de PBS. Após 3 horas de inoculação, os animais foram sacrificados, a pele removida e o halo hemorrágico na superfície interna da pele foi medido com um paquímetro digital *DIGMESS* 100.174BL.

6.7.2) Atividade Edematogênica.

Grupos de 3 camundongos (20-25g) foram injetados subcutaneamente na pata direita com 25µL de solução contendo 10µg de amostra dissolvidos em PBS. O grupo controle recebeu 25µL de PBS. Em diferentes intervalos de tempo o aumento da área na pata dos camundongos foi medida com um paquímetro digital *DIGMESS* 100.174B.

6.7.3) Atividade Desfibrinogenante.

A Atividade desfibrinogenante foi realizada conforme o método descrito por *Gene et al* [33], com algumas modificações. Foram injetados i.p. 40µg de peçonha de *Bothrops moojeni* e da metaloproteinase *BthMP* dissolvidos em 50µL de PBS e 50µL de PBS em camundongos controle. Os camundongos foram sacrificados após duas horas e realizados a punção cardíaca, o sangue foi transferido para um tubo de ensaio de vidro e observado o tempo de coagulação sanguínea. Este experimento foi realizado com n=3.

6.7.4) Alterações Morfológicas Induzidas em Músculo Gastrocnemius de Camundongos.

A evolução do dano tecidual local induzido pela peçonha de *Bothrops moojeni* e pela metaloproteinase *BthMP* foi analisada por microscopia de luz, por meio da injeção de 25µg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e de 50µg da metaloproteinase *BthMP* no músculo gastrocnemius direito de camundongos da linhagem Swiss, (n=3, 20-25g). Os animais foram sacrificados após 6 e 24 horas após a administração das amostras. A porção central do músculo gastrocnemius foi retirada e colocada em solução fixadora (formol 10% em PBS) durante 24 horas. Após a fixação, foi realizada a desidratação em uma série de álcoois em concentrações crescentes de 50 a 100%, em seguida os tecidos foram incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram aparados e então seccionados com auxílio de um micrótomo. Cortes de 6µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina, montados em lâmina e lamínula, examinados ao microscópio óptico e fotografados.

6.8) Análise Estatística.

Para todos os resultados foram realizadas análises estatísticas utilizando o teste Kruskal-Wallis com significância de 0,05 utilizando o programa R Language (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2006). Os dados são mostrados pela média $\pm$ SD (Desvio Padrão).

7- RESULTADOS e DISCUSSÃO

As serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae) são responsáveis pela grande maioria dos casos de acidentes ofídicos ocorridos em regiões de países de clima tropical ou subtropical. No Brasil, em particular, os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* representam cerca de 90% dos casos notificados [7, 9, 34]. Na região do Brasil Central, em especial no município de Uberlândia e Alto Paranaíba (Triângulo Mineiro), há uma grande incidência de acidentes com a espécie *Bothrops moojeni* (Caiçaca) [7]. Os venenos do gênero *Bothrops* são caracterizados por uma alta atividade proteolítica, e há relatos de que a espécie *Bothrops moojeni* apresenta uma diversidade de enzimas proteolíticas, o que a caracteriza como uma das maiores potencialidade proteolítica entre as espécies deste gênero [20, 21].

Neste trabalho nós relatamos a purificação e caracterização bioquímica de uma nova metaloproteinase do veneno de *Bothrops moojeni* (Caiçaca) pela combinação de dois passos cromatográficos: cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel) e gel filtração (Sephadex G-75). Inicialmente, cerca de 200mg de veneno bruto de *Bothrops moojeni* foram aplicados em uma coluna de DEAE-Sephacel, na qual obtivemos seis frações D1, D2, D2a, D3, D3a e D4 (fig. 1A). A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino e caseína foi investigada, sendo que as frações D2, D3 e D3a apresentaram os melhores resultados. No entanto, D3 e D3a também apresentaram alta atividade coagulante sobre o plasma bovino, o que indica a presença de serinoproteases na amostra. Inicialmente, como o objetivo deste trabalho era de purificar uma nova metaloproteinase e tendo em vista o bom perfil em PAGE-SDS de D2, o foco deste trabalho foi direcionado para esta fração, a qual foi recromatografada em gel de Sephadex G-75. Neste segundo passo cromatográfico obtivemos a metaloproteinase denominada *BthMP*

(Metaloproteinase do veneno de *Bothrops moojeni*) (fig. 1B). A amostra apresentou um bom grau de pureza e demonstrou ser formada por uma única cadeia polipeptídica, como pode ser observado por PAGE-SDS (fig. 1C) e em condições nativas PAGE para proteínas básicas (fig. 1D).

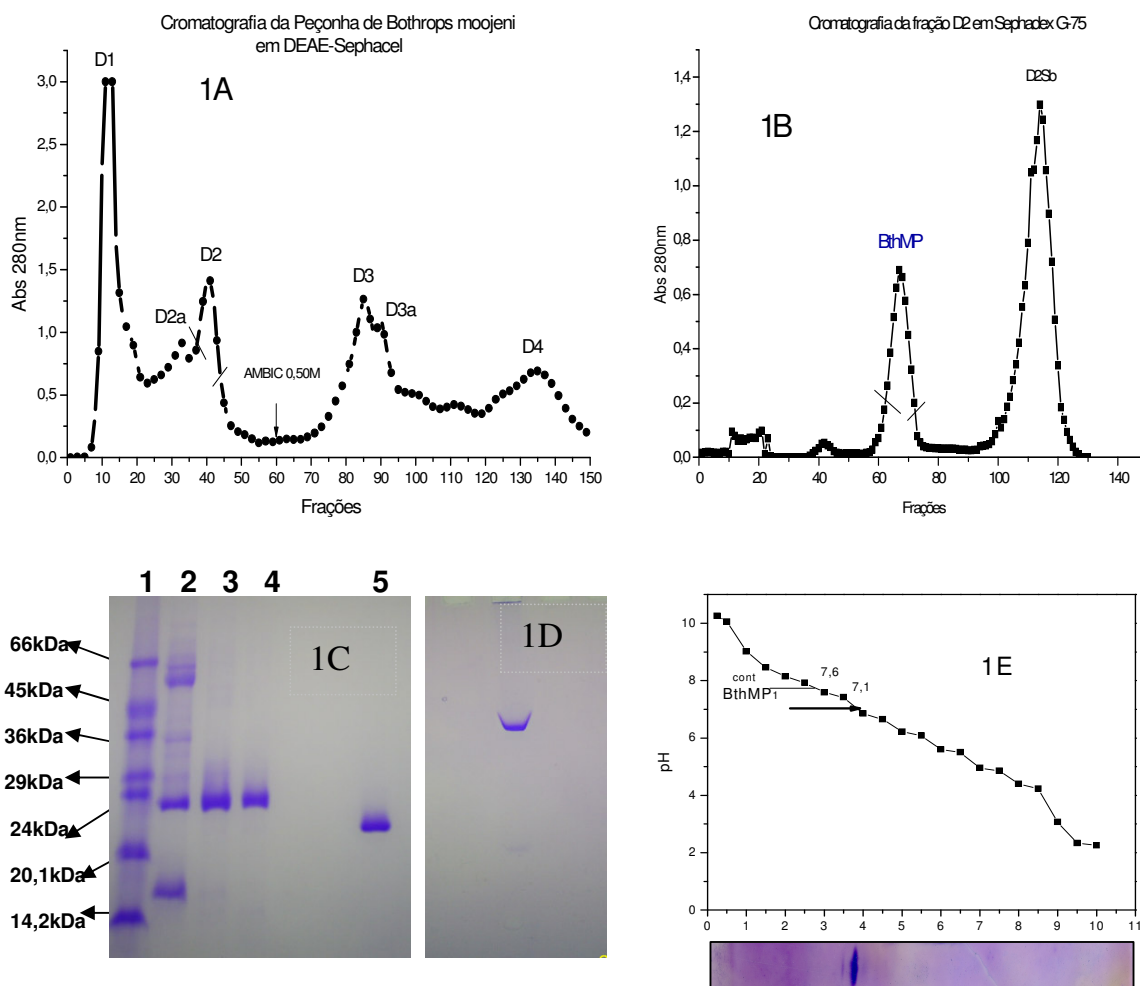


Figura 1: Purificação de *BthMP*. (1A) Cromatografia do veneno de *Bothrops moojeni* em coluna de DEAE-Sephacel, equilibrada e eluída com tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05M, pH 7,8, estabelecendo-se um gradiente convexo com AMBIC 0,05M a 0,50M a partir da fração nº 60. As frações foram coletadas num fluxo de 15mL/h. (1B) cromatografia da fração D2 em Gel de Sephadex G-75, equilibrada e eluída com tampão AMBIC 0,05M, pH=7,8. As frações foram coletadas num fluxo de 15mL/h. (1C) PAGE-SDS a 14% com agentes desnaturantes: Linhas: 1-Padrão de peso molecular Dalton Mark VII-L (com β-mercaptoetanol); 2- 10µg Peçonha de *Bothrops moojeni*; 3- 10µg Fração D2;4-10µg *BthMP* c/β-mercaptoetanol; 5- 10µg.*BthMP* s/β-mercaptoetanol (1D) PAGE nativa a 10%

para proteína básica em tampão β -alanina e ácido acético a 0,03M, pH 4,5, com 10 μ g de BthMP; (1E) Gel de focalização isoeletrica de BthMP.

A massa molecular da proteína foi calculada por mobilidade relativa em PAGE-SDS, tomando como referência o padrão de peso molecular (Dalton Mark VII-L da Sigma Chem. Co.) (fig. 1C). A protease isolada que representa cerca de 2,3%(Abs_{280nm}) da peçonha bruta apresentou massa de 23,5 kDa e 22 kDa na presença e ausência de β -mercaptoetanol, respectivamente. Esta diferença pode ser explicada, pois, na presença de β -mercaptoetanol, a proteína sofre uma desnaturação mais efetiva pelo rompimento das pontes dissulfetos, aumentando assim o seu tamanho aparente e diminuindo sua migração em relação à proteína sem β -mercaptoetanol. Esta massa é semelhante à descrita para outras metaloproteases como a moojeni protease A de 20,4 kDa, também de *Bothrops moojeni* [20] , BaP1 de *Bothrops asper* com 22,7 kDa [13], Neuwiedase de *Bothrops neuwiedi* 25 e 20 kDa [10], Cotiaractivase de *Bothrops cotiara* 23 kDa [15], Leuc-a de *Bothrops Leucurus* 23 kDa [8].

Na tentativa de determinar a sequência N-terminal, uma amostra de *BthMP* foi aplicada em PAGE-SDS e posteriormente transferida para membrana de PVDF, na qual a banda protéica foi selecionada e aplicada em um aparelho seqüenciador automático de proteínas. A protease *BthMP* mostrou-se resistente ao seqüenciamento automatizado, indicando que seu N-terminal está bloqueado, provavelmente resíduo *Pyro-Glu*, como já relatado para outras metaloproteínas dos venenos de serpentes [8, 10]. A focalização isoeletrica da amostra apresentou uma banda intensa com ponto isoeletrico (pI) de 7,1 e um pequeno contaminante com pI de 7,6 (fig. 1E).

Uma pequena amostra de *BthMP* (cerca de 5mg) foi cromatografada em uma resina de afinidade hidrofóbica Phenyl-Sepharose CL-4B, na expectativa de

obter a metaloproteinase *BthMP* livre de seu contaminante. Entretanto, obtivemos um pico único e o perfil em PAGE-SDS foi o mesmo da amostra obtida em Sephadex G-75 (resultados não mostrados), o que nos leva a concluir que este contaminante deve ser uma isoforma, devido à grande similaridade das características químicas já relatadas. Esta dedução foi fortemente reforçada pela ausência de atividades coagulante, esterásica sobre o TAME e hemolítica indireta (fosfolipase A₂) (resultados não mostrados), também pela ausência de inibição por β -mercaptoetanol, Aprotinina e Leupetina sobre o fibrinogênio bovino (resultado não mostrado) e de Benzamidina, Aprotinina e Leupeptina sobre a caseína (fig. 2B). Tais resultados portanto, descartam a presença de contaminantes como serinoproteases e/ou fosfolipases em nossa amostra; e não representam uma grande surpresa, considerando-se a grande diversidade de isoformas já descritas em peçonhas botrópicas [10, 18, 20, 21, 22, 35, 36, 37].

A metaloproteinase *BthMP* apresentou alta atividade proteolítica (fig. 2A e 2B). A figura 2A mostra a ação proteolítica de *BthMP*, quando 5 μ g da enzima degradou completamente a cadeia A α e parcialmente a cadeia B β do fibrinogênio bovino com apenas 5 minutos de incubação; com 15 minutos as duas cadeias (A α e B β) foram completamente degradadas, sendo que a cadeia γ permaneceu inalterada com até 60 minutos de incubação. Com base na hidrólise das cadeias do fibrinogênio, as enzimas fibrinogenolíticas de peçonhas de serpentes podem ser classificadas como α , β ou γ fibrinogenases. Outro dado importante é que as α -fibrinogenases geralmente apresentam atividade hemorrágica (as metalo da classe P-I, são não hemorrágicas ou fracamente hemorrágicas) e são isentas de atividades coagulante e esterásica; enquanto as β -fibrinogenases possuem em geral atividades coagulante e esterásica, sendo isentas de atividade hemorrágica.

Baseado na degradação das cadeias A α e B β do fibrinogênio, podemos concluir que *BthMP* pode ser classificada como uma α -fibrinogenase. A alta atividade proteolítica de *BthMP* também foi observada sobre a caseína por espectrofotometria onde notamos que a atividade catalítica da enzima foi quase o dobro daquela observada para a peçonha bruta (fig. 2B). Estas propriedades são semelhantes à de muitas outras proteases já purificadas tais como: moojeni protease A também de *Bothrops moojeni* [20, 38]; Neuwiedase de *Bothrops neuwiedi* [10]; BaP1 de *Bothrops asper* [13]; BlaH1 de *Bothrops lanceolatus* [39] e Leuc-a de *Bothrops Leucurus* [8].

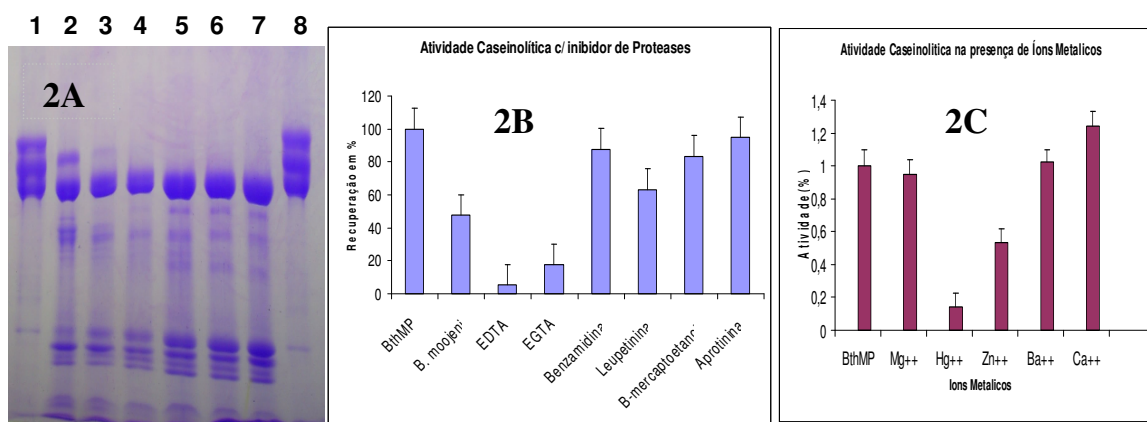


Figura 2: Atividade Proteolítica de *BthMP*. (2A) PAGE-SDS a 14%, dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino com 10 μ g de *BthMP* em diferentes intervalos de tempo. Linha 1 e 8: Fibrinogênio controle, Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7: Fibrinogênio incubado com *BthMP* por 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos respectivamente. (2B) Atividade Caseinolítica determinada por Abs_{280nm}, comparativa entre *BthMP* e o veneno de *Bothrops moojeni* e *BthMP* na presença de inibidores de proteases. (2C) Atividade Caseinolítica determinada por Abs_{280nm} de *BthMP* na presença de íons metálicos a 10mM.

O efeito de inibidores da atividade proteolítica foi testado sobre o fibrinogênio bovino (resultado não mostrado) e sobre a caseína (fig. 2B). Estes ensaios revelaram que *BthMP* é uma protease metal-dependente, tendo em vista

que a atividade fibrinogenolítica foi parcialmente inibida por EDTA e 1,10-fenantrolina; a atividade caseinolítica foi fortemente inibida por EDTA e EGTA e praticamente não sofreu alteração na presença de β -mercaptoetanol, Benzamidina, Aprotinina e Leupeptina (fig. 2B); dados que confirmam a dependência de íons metálicos pela *BthMP*. Com base nos resultados apresentados e tendo em vista que os inibidores EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina são agentes quelantes de metal, podemos inseri-la na vasta classe das metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMPs). As SVMPs são classificadas em quatro classes (PI a PIV), com base em seu domínio estrutural e em suas massas molares [1, 2, 5]. As metaloproteinases da classe P-I são caracterizadas por possuírem baixa massa molecular, apresentarem apenas o domínio metaloproteinase, degradarem preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio e apresentarem baixa ou nenhuma atividade hemorrágica. Na classe P-II, encontramos as metaloproteinases com os domínios metaloproteinase e desintegrina; as da classe P-III são conhecidas como grandes proteínas hemorrágicas, possuem além dos domínios metaloproteinase e desintegrina, um terceiro domínio rico em cisteína na região C-terminal; enquanto as da classe P-IV possuem todos os domínios da classe P-III, mais o domínio semelhante à lectina [1, 2, 5]. Ainda sobre o efeito dos inibidores de proteases, percebemos que a atividade caseinolítica de *BthMP* praticamente não foi alterada na presença de β -mercaptoetanol (fig. 2B), o que nos leva a deduzir que a protease estudada não deve apresentar, ou apresenta em pouca quantidade, pontes dissulfeto no seu sítio catalítico.

Os efeitos de íons metálicos também foram testados sobre a atividade caseinolítica (fig. 2C). Os resultados mostraram que a atividade de *BthMP* foi

inibida cerca de 80% por Hg^{++} e cerca de 50% por Zn^{++} , enquanto Mg^{++} e Ba^{++} praticamente não interferiram, e o íon Ca^{++} estimulou em cerca de 25% a atividade proteolítica. Isto nos leva a deduzir que a metaloprotease *BthMP*, além de possuir o íon zinco coordenado no sítio catalítico [1, 2], deve apresentar um sítio catalítico externo específico para o íon Ca^{++} . Esta especificidade é clara tendo em vista que os íons Mg^{++} e Ba^{++} , que são quimicamente semelhantes ao cálcio, não interferem na ação proteolítica de *BthMP* [10, 8, 9].

A atividade fibrinogenolítica foi utilizada como parâmetro para medir a estabilidade da enzima frente à variação de pH e temperatura. Os resultados revelaram que a enzima foi ativa sobre as cadeias A α e B β do fibrinogênio bovino com o pH variando de 6 a 9, e temperaturas entre 5 a 40°C; sendo que apresentou uma maior atividade proteolítica nos pHs 7 e 8 e nas temperaturas de 20 a 25°C; perdendo completamente a sua atividade proteolítica quando submetida à temperatura maior ou igual a 50°C e em pHs abaixo de 6 (resultados não mostrados). A *BthMP* também apresentou atividade fibrinolítica provocando halos de lise quando aplicada em placas de fibrina. Comparando-se a mesma dose de *BthMP* com a da peçonha bruta, percebemos um aumento na atividade fibrinolítica entre 30-40%. (fig. 3A). Estes resultados são encontrados na literatura para outras proteases desta classe [40].

As lesões após o envenenamento por serpentes botrópicas são manifestadas de imediato por edema e dor, acompanhado de quadro hemorrágico e alterações na hemostasia. Em consequência há o recrutamento de leucócitos e mediadores inflamatórios no local da picada. Estes amplificam a resposta inflamatória e contribuem para o processo de necrose [9, 11, 41, 42, 43, 44]. A contribuição de *BthMP* para os efeitos lesivos induzidos pela peçonha bruta de

Bothrops moojeni foi avaliada “in vivo” em camundongos para as atividades: hemorrágica, edematogênica, incoagulabilidade sangüínea e alterações morfológicas em músculo gastrocnêmio de camundongos. Na atividade hemorrágica (fig. 4), observamos que *BthMP* pode ser classificada como fracamente hemorrágica, tendo em vista que 30 µg de *BthMP* provocou uma hemorragia comparada com 10µg da peçonha bruta. Somando-se estes resultados de baixa atividade hemorrágica, degradação preferencialmente da cadeia A α do fibrinogênio, massa molecular de aproximadamente 23,5kDa, podemos inseri-la na classe P-I das SVMPs juntamente com outras proteases como a *Neuwiedase* de *Bothrops neuwiedi* [10], *BaP1* de *Bothrops asper* [13], *moojeni protease A* de *Bothrops moojeni* [20] e *BlaH1* de *Bothrops lanceolatus* [39]. A baixa atividade hemorrágica de *BthMP* pode ser explicada pela sua estrutura, já que as metaloproteinases da classe P-I apresentam apenas o domínio metaloproteinase na sua forma madura, não possuindo assim o domínio desintegrina (característico da metaloproteinases das classes P-II, P-III que são as potentes hemorraginas e P-IV)[1, 2] e certamente a hemorragia causada por essa toxina deve ser atribuída a sua ação proteolítica sobre componentes da membrana basal [14]. As metaloproteinases da classe P-I, apesar de serem não hemorrágicas ou fracamente hemorrágicas, demonstram uma variedade de efeitos biológicos que podem estar relacionados com sua estrutura e o modelo de pontes dissulfeto apresentados por elas [1].

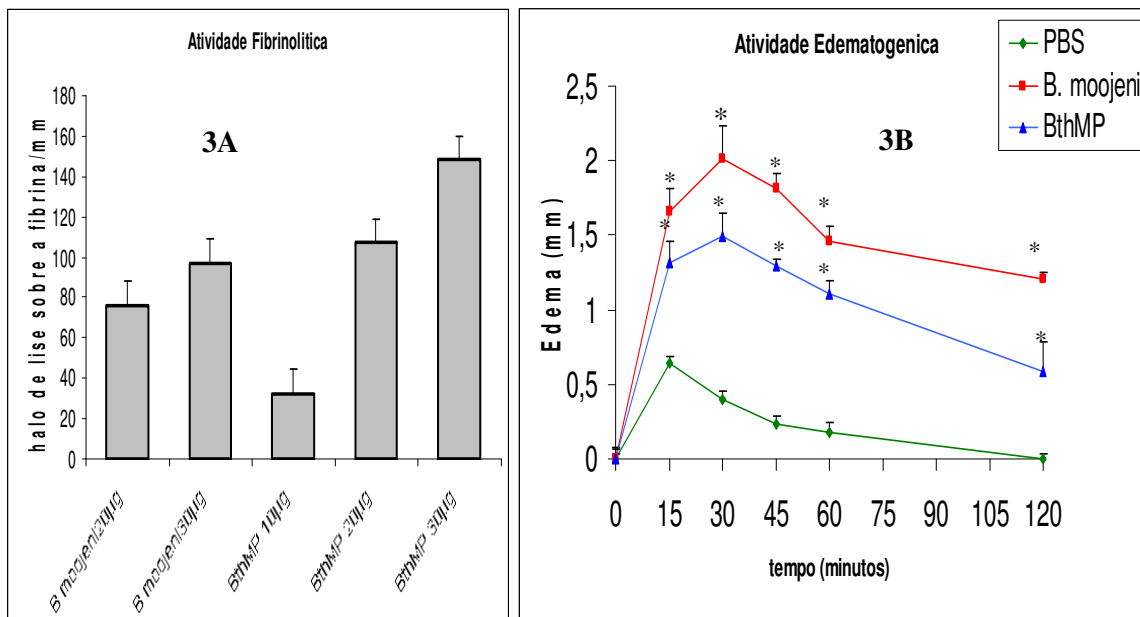


Figura 3:Atividade Fibrinolítica e Edematogênica de BthMP e da peçonha de *Bothrops moojeni*. (3A) Halo de lise sobre a fibrina com 20 e 30µg da peçonha de *Bothrops moojeni* e 10, 20 e 30µg da metaloprotease BthMP, incubada a 37°C por 24 horas em gel de fibrina (n=3). (3B) Atividade edematogênica tempo-dependente de 10µg da PB de *B. moojeni* e da BthMP. Os dados referem-se a media de grupos de três camundongos Swiss machos de peso entre 20-25g (n=3). (*) Diferença significativa em relação ao controle com apenas PBS.

BthMP foi capaz de induzir o edema quando administrado na pata de camundongos. O edema máximo induzido pela metaloproteinase foi alcançado com o tempo de 30 minutos, igual ao do veneno bruto (fig. 3B). A ação edematogênica de *BthMP* é bastante relevante, considerando-se que corresponde a cerca de 78% do edema provocado pelo veneno bruto. Este resultado é semelhante ao relatado para *neuwiedase* de *Bothrops neuwiedi* [10] e *BaP1* de *Bothrops asper* [13]. A atividade edematogênica de peçonhas ofídicas é resultado da ação sinérgica entre diversos componentes do veneno que induzem a liberação de mediadores químicos como as citocinas (proteínas de baixo peso

molecular que mediam todas as fases da resposta inflamatória), causando aumento na permeabilidade das membranas e extravasamento de líquidos para o espaço extracelular [13, 14, 41, 43]. Sendo *BthMP* uma metaloproteinase (classe PI) que apresenta apenas o domínio metaloproteinase, o edema induzido por esta toxina pode ser uma consequência da degradação proteolítica de componentes na membrana basal ou ainda pela liberação dos mediadores químicos em resposta a ação enzimática.

Dada a grande contribuição desta toxina para a atividade edematogênica da peçonha bruta, investigar o mecanismo de ação de *BthMP* poderá trazer resultados muito promissores para os pesquisadores que investem na busca de componentes terapêuticos para o tratamento de efeitos locais causados pelo envenenamento botrópico.

A incoagulabilidade sangüínea é observada em muitos envenenamentos por serpentes [40]. Este é o resultado do consumo total do fibrinogênio plasmático pelas enzimas fibrin(ogen)olíticas, assim como, pela ativação dos fatores da coagulação, sobretudo FII e FX, que causam depleção ou consumo de todos os fatores da via comum da cascata [12]. *BthMP* também foi capaz de provocar incoagulabilidade sangüínea quando administrada com dose intraperitonal de 40µg em camundongos. Isto nos leva a propor que *BthMP* não sofre a ação de inibidores endógenos de metaloproteinase, sendo assim capaz de provocar a degradação “in vivo” de fibrinogênio plasmático, tornando o sangue menos viscoso e aumentando o seu fluxo. Este é sem dúvida outro achado importante para estudos futuros sobre a ação de *BthMP* e possível aplicação terapêutica desta nova metaloproteinase em tratamentos de patologias relacionadas com

distúrbios na hemostasia e circulação sanguínea. Acerca deste resultado encontramos relatos em [12, 40].

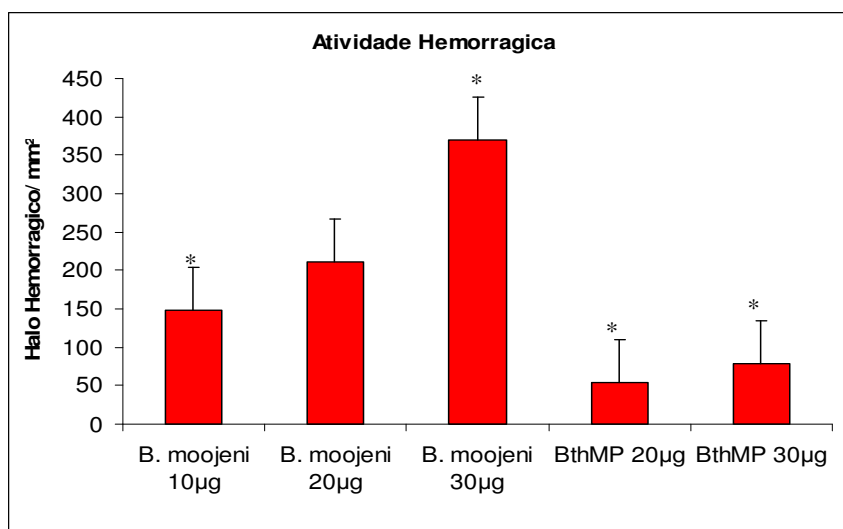
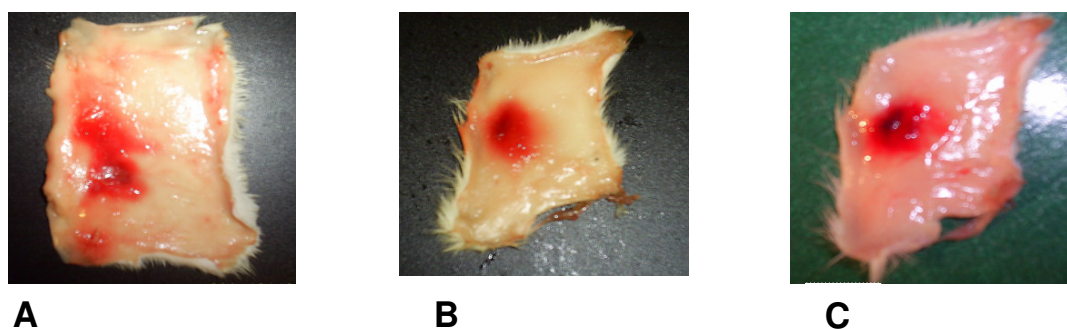


Figura 4: Atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* e por *BthMP*. A: 10µg de *Bothrops moojeni*; B e C: 20µg e 30µg de *BthMP*; Os resultados apresentados no gráfico representam uma média de n=5. (*) Diferença significativa em relação ao veneno bruto com a protease *BthMP*.

Ainda sobre as atividades in vivo, a *BthMP* foi capaz de provocar importantes alterações morfológicas em músculo gastrocnêmio de camundongos. Observando as fotomicrografias de corte em músculo gastrocnêmio de camundongos (fig. 5) percebemos que, quando injetada com uma dose de 50µg e

comparada a doses de 25µg da peçonha bruta, *BthMP* induziu hemorragia, necrose e infiltrado leucocitário; porém, as alterações provocadas pela peçonha foram em todo o experimento mais proeminentes que da toxina. 25µg da peçonha após 6 horas de inoculação revelam uma intensa ação hemorrágica, elevado infiltrado leucocitário e evidentes células necrosadas. Com o período de 24 horas de aplicação da peçonha, podemos perceber a redução dos leucócitos, entretanto o quadro hemorrágico e necrótico permaneceram praticamente inalterados. Já *BthMP* com uma dose de 50µg revelou, nas primeiras 6 horas de inoculação, um pequeno quadro hemorrágico, elevado infiltrado leucocitário e células necrosadas. Entretanto, com o período de 24 horas de inoculação, percebemos uma sensível diminuição em todas estas alterações. Isto pode ser atribuído à diversidade de toxinas na peçonha bruta e às suas múltiplas funções, pois estas toxinas além de afetarem a lâmina basal e matriz celular, podem causar danos a microvasculatura, comprometendo o fluxo sanguíneo para a área afetada e consequentemente dificultando a sua regeneração; por outro lado, no que diz respeito às lesões provocadas pelas metaloproteinases da classe P-I, as quais não afetam a integridade vascular, percebemos uma regeneração mais completa [11, 41, 42, 43, 44]. Esta miotoxicidade observada para *BthMP* não pode ser devido à presença de contaminante do tipo fosfolipases A₂ na amostra, por dados já discutidos anteriormente.

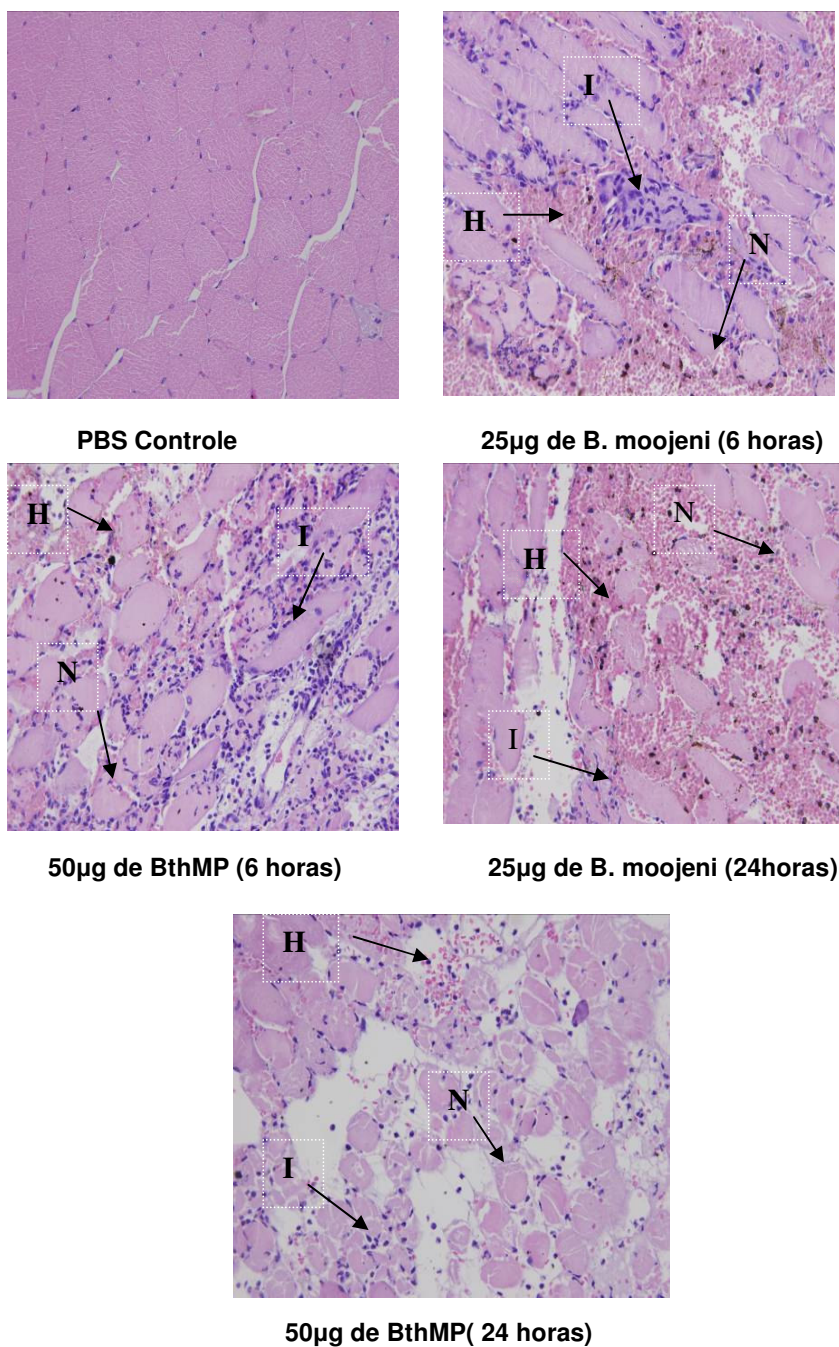


Figura 5: Fotomicrografia de cortes finos transversais com 6,0 µm de espessura do músculo gastrocnêmio direito de camundongos, após 6 e 24 horas de inoculação. As alterações foram induzidas por 25µg da peçonha *Bothrops moojeni* e 50µg de *BthMP*. H = Hemorragia, N = Necrose, I = Infiltrado Leucocitario.

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, podemos perceber a semelhança entre atividades biológicas da metaloproteinase fibrin(ogen)olítica *BthMP* com a moojeni protease A, do mesmo veneno. Entretanto há dados que nos permitem concluir que a *BthMP* trata-se de uma nova metaloproteinase isoforma da moojeni protease A, tais como: massa molecular de 20,4 kDa para a moojeni protease A e 23,5 kDa para *BthMP*; o ponto isoelétrico de 7,7 para a moojeni protease A e de 7,1 para *BthMP*; N-terminal descrito como sendo a Leucina para a moojeni protease A, enquanto o da *BthMP* é bloqueado (provavelmente resíduo *Pyro-Glu*). Esta protease também apresenta grandes semelhanças em atividades biológicas com outras metaloproteinases de venenos *Botrópicos*, como: *Neuwiedase* de *Bothrops neuwiedi* [10], *BaP1* de *Bothrops asper* [13], *BlaH1* de *Bothrops lanceolatus* [39], ou seja, estas atividades biológicas são características comuns para as metaloproteinases da classe PI dos venenos de serpentes.

Sobre fibrinogenases purificadas do veneno de *Bothrops moojeni* além da moojeni protease A [20], encontramos relatos na literatura da *MPB* uma metaloproteinase hemorrágica purificada por *Serrano et al* [36] que apresenta massa molecular 65 kDa, pI maior que 7,0 e mostrou ser capaz de degradar todas as cadeias do fibrinogênio ($\alpha>\beta>\gamma$). Ainda *Serrano et al* [35], isolou duas serinoproteases *MSP1* e *MSP2*, que apresentam, respectivamente, massas moleculares de 34 e 38 kDa e foram inibidas por PMSF; e *Oliveira et al* [21] purificou e caracterizou uma nova α -fibrinogenase com característica de serinoprotease denominada *moo3* que apresenta massa molecular de 26 kDa e pI de 7,8.

As enzimas proteolíticas dos venenos de serpentes têm despertado interesses dos pesquisadores, em função de suas prováveis aplicações terapêuticas. *BthMP* apresentou, entre outras características, uma alta atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, capacidade de degradar a fibrina, considerável contribuição na ação edematogênica e tornou o sangue de camundongos incoagulável. Estes resultados sugerem uma melhor investigação sobre a estrutura, função, bem como conhecer o seu comportamento sobre componentes da matriz extracelular e os principais sintomas “in vivo” causados pela toxina; visando assim uma possível aplicação clínica em patologias tais como trombose, infarto, distúrbios vasculares e relacionados com a circulação sanguínea.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. W. Fox, S. M. T. Serrano, *Toxicon* 45 (2005) 969-985.
- [2] O. H. P. Ramos, H. S. Selistre-de-Araujo, *Comp. Biochem. Phys. C* 142 (2006) 328-346.
- [3] F. Grams, R. Huber, L. F. Kress, *FEBS Lett* 335 (1993) 76-80.
- [4] Wen-Jeng Wang, C. Shih, T. Huang, *Biochimie* 87 (2005) 1065-1077.
- [5] J. B. Bjarnasson, J. W. Fox, *Pharmacol. Ther.* 62 (1994) 325-372.
- [6] Z. Lou, J. Hou, X. Liang, J. Chen, P. Qiu, Y. Liu, M. Li, Z. Rao, G. Yan, J. Struct. Biol. 152 (2005) 195-203.
- [7] C. J. Silva, M. T. Jorge, L. A., Ribeiro, *Toxicon* 41 (2003) 251-255.
- [8] C. A. Bello, A. L. N. Hermógenes, Magalhães, A., S. S. Veiga, L. H. Gremski, M. Richardson, E. F. Sanchez , *Biochimie* 88 (2006) 189- 200.
- [9] J. M. Gutiérrez, J. Núñez, T. Escalante, A. Rucavado, *Microvasc. Res.* 71(2006) 55-63.
- [10] V. M. Rodrigues, A. M. Soares, R. Guerra-Sá, V. Rodrigues, M. R. M. Fontes, J. R. Giglio, *Arch. Biochem. Biophys.* 381(2000) 213-224.
- [11] V. M. Rodrigues, A. M. Soares, S. H. Andrião-Escarso, A. M. Rucavado, J. M. Gutiérrez, J. R. Giglio, *.Biochimie* 83(2001) 471-479.
- [12] F. S. Markland, *Toxicon* 36(1998) 1749-1800.
- [13] J. M. Gutiérrez, M. Romeno, C. Diaz, G. Borkow, M. Ovadia, *Toxicon* 33 (1995) 19-29.

- [14] A. Franceschi, A. Rucavado, N. Mora, J. M. Gutiérrez. *Toxicon* 38 (2000) 63-77.
- [15] Y. A. Senis, P. Y. Kim, G. L. J. Fuller, A. Garcia, S. Prabhakar, M. C. Wilkinson,
H. Brittan, N. Zitzmann, R. Wait, D. A. Warrell, S. P. Watson, A. S. Kamiguti,
D.
G. Theakston, M. E. Nesheim, G. D. Laing, *Biochim. Biophys. Acta* 1764 (2006)
Issue 5, 863-871.
- [16] L. F. M. Izidoro, M. C. Ribeiro, G. R. L. Souza, C. D. Sant`Ana, A. Hamaguchi,
M. I. Homs-Brandeburgo, L. R. Goulart, R. O. Beleboni, A. Nomizo, S. V. Sampaio, A. M. Soares, V. M. Rodrigues, *Bioorgan. Méd. Chem.* (in press,2006).
- [17] M. V. Mazzi, S. Marcussi, G. B. Carlos, R. G. Stábeli, J. J. Franco, F. K. Ticli, A.
C. O. Cintra, S. C. França, A. M. Soares, S. V. Sampaio, *Toxicon* 44 (2004) 215-223.
- [18] M. I. Homs-Brandeburgo, L. S. Queiroz, H. Santo-Neto, L. Rodrigues-Simioni, J.
R. Giglio, *Toxicon* 26 (1988) 615-627.
- [19] M. Maruyama, M. Sugiki, K. Anai, E. Yoshida, *Toxicon* 40 (2002) 1223-1226.
- [20] M. T. Assakura, A. P. Reichl, M. C. A. Asperti, F. R. Mandelbaum, *Toxicon* 23 (1985) 691-706.
- [21] F. Oliveira, V. M. Rodrigues, M. H. Borges, A. M. Soares, A. Hamaguchi, J. R.

- Giglio, M. I. Homsí-Brandeburgo, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 47 (1999) 1069-1077.
- [22] A. M. Soares, S. H. Andrião-Escarso, Y. Angulo, B. Lomonte, J. M. Gutiérrez, S.
- Marangoni, M. H. Toyama, R. K. Arni, J. R. Giglio, *Arch. Biochem. Biophys.* 373 (2000) 7-15.
- [23] R. F. Itzhaki, D. M. Gill. *Anal. Biochem.* 9 (1964) 401-410.
- [24] U. K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [25] R. A. Reisfeld, V. L. Lewis, D. E. Williams, *Nature* 195 (1962) 281-283.
- [26] O. Vestberg, *Arch. Biochem. Biophys.* 257(1972) 11-13.
- [27] T. Astrup, S. Mullertz. *Arch. Biochem. Biophys.* 40 (1952) 346-351.
- [28] M. T. Assakura, M. F. Furtado, F. R. Mandelbaum, *Comp. Biochem. Phys. B* 102 (1992) 727-732.
- [29] B. C. W. Hummel, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 1393-1399.
- [30] J. M. Gutiérrez, C. Avila, E. Rojas, L. Cerdas, *Toxicon* 26 (1988) 411-413.
- [31] S. J. Van der Walt, F. J. Joubert. *Toxicon* 9 (1971) 153-161.
- [32] T. Nikai, N. Mori, M. Kishima, H. Sugihara, A. T. Tu. *Arch. Biochem. Biophys.* 231 (1984) 309-311.
- [33] J. A. Gene, A. Roy, G. Rojas, J. M. Gutiérrez, L. Cerdas, *Toxicon* 27 (1989) 841-848.
- [34] T. A. Castoe, C. L. Parkinson, *Mol. Phylogenet. Evol.* 39 (2006) 91-110.
- [35] S. M. T. Serrano, N. F. C. Matos, F. R. Mandelbaum, C. A. M. Sampaio, *Toxicon*

- 31 (1993a) 471-481.
- [36] S. M. T. Serrano, C. A. M. Sampaio, F. R. Mandelbaum, *Toxicon* 31 (1993b) 483-492.
- [37] A. M. Soares, V. M. Rodrigues, M. I. Homsí-Brandeburgo, M. H. Toyama, F. R. Lombardi, R. K. Arni, J. R. Giglio, *Toxicon* 36 (1998) 503-514.
- [38] P. A. Reichl, F. R. Mandelbaum, *Toxicon* 31 (1993) 187-194.
- [39] A. Stroka, J. L. Donato, C. Bon, S. Hyslop, A. L. Araujo, *Toxicon* 45 (2005) 411-420.
- [40] S. Swenson, F. S. Markland, *Toxicon* 45 (2005) 1021-1039.
- [41] J. M. Gutiérrez, A. Rucavado, *Biochimie* 82 (2000) 841-850.
- [42] G. D. Laing, P. B. Clissa, R. D. Theakston, A. M. Moura-da-Silva, M. J. Taylor, *Eur J. Immunol.* 33 (2003) 3458-3463.
- [43] C. M. Fernandes, S. R. Zamuner, J. P. Zuliani, A. Rucavado, J. M. Gutiérrez, C. F. P. Teixeira, *Toxicon* 47 (2006) 549-559.
- [44] C. C. Gay, L. C. Leiva, S. Marunak, P. Teibler, O. A. Pérez, *Toxicon* 46 (2005) 546-554.