



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

Estudos biológicos e estruturais da BthaTL, uma
serinopeptidase recombinante da peçonha de
Bothrops alternatus (Viperidae, Crotalinae)

Ana Flávia Vitorino-Cardoso

UBERLÂNDIA, MG

2005



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

Estudos biológicos e estruturais da BthaTL, uma
serinopeptidase recombinante da peçonha de
Bothrops alternatus (Viperidae, Crotalinae)

ALUNA: Ana Flávia Vitorino-Cardoso

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

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

UBERLÂNDIA, MG

2005

V845e Vitorino-Cardoso, Ana Flávia, 1978-

Estudos biológicos e estruturais da BthTL, uma serinopeptidase recombinante da peçonha de *Bothrops alternatus* (Viperidae, Crotalinae) / Ana Flávia Vitorino-Cardoso. - Uberlândia, 2005.

169f. : il.

Orientador: Maria Inês Homs Brandeburgo.

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

Inclui bibliografia.

1. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 2. Proteinase - Teses. 3. Serina proteinases - Teses. 4. Proteínas - Teses. 5. Bothrops - Teses. I. Brandeburgo, Maria Inês Homs. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:615.919:598.126 (043.3)



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

Estudos biológicos e estruturais da BthaTL,
uma serinopeptidase recombinante da peçonha de
Bothrops alternatus (Viperidae, Crotalinae)

Ana Flávia Vitorino-Cardoso

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof.^a Dr.^a Maria Inês Homsí Brandeburgo (Orientadora)

Examinadores: Prof.^a Dr.^a Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

Prof.^a Dr.^a Cecília Lomônaco de Paula

Prof. Dr. Richard John Ward

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Data da Defesa: 03/06/2005.

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

(Orientadora)

Uberlândia, 04/07/2005.



“PENSE EM MOVER O MUNDO.
O PRIMEIRO PASSO SERÁ MOVER A SI MESMO.”

PLATÃO, FILÓSOFO GREGO (428-347 A.C.)

Dedico este trabalho e todo o esforço nele empreendido a duas pessoas muito importantes: minha avó, Antonia Pelegrini, por todas as lições de sabedoria, coragem, paciência e carinho que ela tem me transmitido ao longo dos anos; e minha mãe, Maria Helena Vitorino Cardoso, que sempre procurou me mostrar a importância dos estudos, incentivando-me a buscar todos os tipos de conhecimento e a aplicá-los corretamente em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Toda realização começa com um projeto pessoal. Assim que me formei bióloga, em fevereiro de 2001, procurei a Profa. Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo, minha orientadora durante o período da graduação, e relatei o que tinha em mente para a pós-graduação: trabalhar com Biologia Molecular. Este ideal foi concretizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, sob co-orientação da Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo. Foi graças a um telefonema da Profa. Maria Inês que a Profa. Heloísa aceitou me receber em seu laboratório, iniciando um período de 2 anos e 9 meses de trabalho que culminou nesta tese. Seria inútil tentar reunir palavras para agradecer a essas duas professoras que acreditaram em mim desde o início, oferecendo-me as condições para correr atrás de um sonho. Devo a vocês grande parte dos conhecimentos que adquiri nas áreas da Bioquímica e da Biologia Molecular, e tenham a certeza de que seus ensinamentos não se restringiram apenas ao aspecto profissional.

Dois amigos queridos, Rodrigo Magrin de Andrade, em Uberlândia, e Oscar Henrique Pereira Ramos, primeiro em São Carlos e posteriormente em Paris, foram essenciais para a finalização desta tese. Rodrigo, muito obrigada pelo seu companheirismo, por ter “segurado as pontas” para mim em Uberlândia, fazendo as minhas matrículas e transmitindo avisos importantes. Oscar, sem sua atenção e disponibilidade eu jamais teria chegado tão longe, e terminaria o Doutorado frustrada, sem ter tido a honra de conhecer a Bioinformática.

Morar sozinha em São Carlos durante 2 anos foi uma experiência valiosa, que me tornou uma pessoa melhor e mais forte. Nunca me esquecerei das caminhadas ecológicas que fazia do meu apartamento até a universidade, e vice-versa, ouvindo música no discman. Poucas vezes a solidão realmente pesou, e quando isso ocorria, eu podia contar com a amizade da Cristina e da Juliana. Alguns minutos no telefone, uma caminhada até a sorveteria, um almoço em família, e pronto: estava tudo bem outra vez. Meninas, vocês foram maravilhosas.

Neste período eu vim a Uberlândia em 10 ocasiões. O tempo de permanência variava, de 3 dias a algumas semanas, mas minhas passagens por aqui sempre eram gratificantes. Muito obrigada, família e amigos, pelas acolhidas sempre tão calorosas e animadas.

Eu não poderia deixar de registrar aqui o meu abraço para o pessoal do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos: Ademar, Bete, Carol, Carmen, Kelli, Laura, Lucas, Marcelo, Márcia, Mônica, Raquel, Renner, Rita, Rodrigo, Sabrina e Verzola. Aprendi muito trabalhando e convivendo com vocês.

Às colegas do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, Renata Santos Rodrigues e Cristiani Baldo, e à Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, meu muito obrigada pelo incentivo.

Finalmente, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR (LBBM) DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (DCF) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR) SOB CO-ORIENTAÇÃO DA PROF.^A DR.^A HELOÍSA SOBREIRO SELISTRE DE ARAÚJO.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
TOXINAS OFÍDICAS E HEMOSTASIA	12
<i>AS SERPENTES</i>	12
CLASSIFICAÇÃO E ASPECTOS EVOLUTIVOS	12
MITOS E VERDADES	16
<i>PEÇONHAS OFÍDICAS: OCORRÊNCIA, SÍNTESE, COMPOSIÇÃO E VARIABILIDADE</i>	21
<i>O PROCESSO DE COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA</i>	23
DESORDENS DA COAGULAÇÃO	30
<i>SERINOPEPTIDASES DE PEÇONHAS OFÍDICAS COM AÇÃO SEMELHANTE À DA TROMBINA</i>	31
MECANISMO DE AÇÃO DAS SERINOPEPTIDASES DA FAMÍLIA DA QUIMIOTRIPSINA	36
BREVE HISTÓRICO DA SISTEMÁTICA BIOLÓGICA	38
BIOINFORMÁTICA	41
<i>MODELAGEM MOLECULAR BASEADA EM HOMOLOGIA</i>	42
<i>FILOGENIA MOLECULAR</i>	45
MÉTODOS BASEADOS NA PARCIMÔNIA	47
MÉTODOS BASEADOS NA DISTÂNCIA ENTRE AS SEQUÊNCIAS	48
OBJETIVOS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	54

CAPÍTULO ÚNICO [Estudos biológicos e estruturais da BthaTL, uma serinopeptidase recombinante da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i> (Viperidae, Crotalinae)]	69
INTRODUÇÃO	70
MATERIAL	75
REAGENTE EMPREGADO NA EXTRAÇÃO DO RNA ^{TOTAL} DAS GLÂNDULAS DE PEÇONHA	76
CEPAS BACTERIANAS DERIVADAS DE <i>E. coli</i>	76
PLASMÍDEOS	76
OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (“PRIMERS”)	76
ENZIMAS	77
ANTICORPOS	78
MARCADORES DE MASSA MOLECULAR	78
MATERIAL PARA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	79
MEMBRANAS / FILTROS PARA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA	79
SUBSTRATOS PARA PROTEÓLISE	79
“KITS”	79
OUTROS REAGENTES	80
METODOLOGIA	81
ESTUDOS BIOLÓGICOS	82
EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS DE PEÇONHA	82
OBTENÇÃO DO RNA TOTAL	82
MONITORAMENTO DO ISOLAMENTO DO RNA TOTAL	83
ELETROFORESES EM GEL DE AGAROSE	84
DESENHO DOS PRIMERS UTILIZADOS, SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO INICIAL DO cDNA CODIFICANTE DA BthaTL	84
REAMPLIFICAÇÃO DO cDNA DE INTERESSE POR PCR	88
VETOR DE CLONAGEM	89
PROCEDIMENTO PARA INSERÇÃO DE UMA DEOXIADENOSINA LIVRE NA EXTREMIDADE 3’ DO cDNA AMPLIFICADO	89
LIGAÇÃO DO INSERTO NO VETOR DE CLONAGEM	91
TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES COM O VETOR DE CLONAGEM	91
VETOR DE EXPRESSÃO	92
SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO	92
TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES COM O VETOR RECOMBINANTE pBthaTL	94
SEQUENCIAMENTO DO INSERTO CLONADO NOS VETORES pGEM®T-Easy E pET-28a	94
ELETROFORESES EM GEL DE POLIACRILAMIDA	95
ENSAIOS DE EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE	95

PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	96
IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA PURIFICADA.....	96
RENATURAÇÃO POR MEIO DE DIÁLISES	97
SEQUENCIAMENTO N-TERMINAL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	97
ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA.....	98
ATIVIDADE CASEINOLÍTICA.....	98
BIOINFORMÁTICA	99
DEDUÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DA BthaTL	99
DETERMINAÇÃO TEÓRICA DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA BthaTL	
RECOMBINANTE	99
BUSCA DE MOTIVOS.....	100
MODELAGEM MOLECULAR BASEADA EM HOMOLOGIA	101
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MODELO GERADO.....	101
RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA.....	103
RESULTADOS	105
ESTUDOS BIOLÓGICOS	106
EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS DE PEÇONHA.....	106
OBTENÇÃO DO RNA TOTAL	106
SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO INICIAL DO cDNA CODIFICANTE DA BthaTL	107
REAMPLIFICAÇÃO DO cDNA DE INTERESSE POR PCR.....	108
LIGAÇÃO DO INSERTO NO VETOR DE CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO DE	
CÉLULAS COMPETENTES.....	108
SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO E TRANSFORMAÇÃO DE	
CÉLULAS COMPETENTES.....	109
SEQUENCIAMENTO DO INSERTO LIGADO AO VETOR pET-28a	111
ENSAIOS DE EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE.....	112
PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	113
IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	115
SEQUENCIAMENTO N-TERMINAL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	116
ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA E CASEINOLÍTICA	116
BIOINFORMÁTICA	117
ALINHAMENTO MÚLTIPLO DA BthaTL COM OUTRAS SERINOPEPTIDASES.....	117
DETERMINAÇÃO TEÓRICA DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA	
BthaTL	119
BUSCA DE MOTIVOS.....	120
MODELAGEM MOLECULAR BASEADA EM HOMOLOGIA	121
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MODELO GERADO.....	128
WHAT IF.....	128
PROCHECK.....	131
RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA.....	136

DISCUSSÃO	138
ANÁLISE BIOLÓGICA	139
ANÁLISE TEÓRICA	144
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
 CONCLUSÕES GERAIS	165
 ANEXOS	167
ANEXO A: PARÂMETROS ESTEREOQUÍMICOS FREQUENTEMENTE ENCONTRADOS EM PROTEÍNAS	168
ANEXO B: DISTÂNCIAS DE LIGAÇÕES ATÔMICAS	169
ANEXO C: ÂNGULOS DE LIGAÇÕES FREQUENTEMENTE ENCONTRADAS EM PROTEÍNAS	169

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3'UTR:** região 3' não traduzida (**3' UnTranslated Region**)
- Å:** ângstrom, unidade de medida correspondente a 10^{-10} metros
- ADP:** adenosina difosfato
- ATP:** adenosina trifosfato
- ATZ:** anilintiazolinona
- BCIP:** 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato de p-toluidina
- BLAST:** programa computacional para busca de homologias locais entre DNAs ou proteínas (**Basic Local Alignment Search Tool**)
- BLOSUM 62:** matriz de substituição de aminoácidos construída com seqüências de proteínas com porcentagem de identidade superior a 62% (**B**locks **S**ubstitution **M**atrix)
- BPTI:** inibidor da tripsina pancreática bovina (**B**ovin **P**ancreatic **T**rypsin **I**nhibitor)
- BthaTL:** proteína recombinante com provável ação trombina-símile, gerada pela expressão em sistema bacteriano de um cDNA obtido a partir do RNA isolado da glândula de peçonha de uma serpente da espécie *Bothrops alternatus* (**B**othrops **a**lternatus **T**hrombin-**L**ike enzyme)
- CD:** dicroísmo circular (**C**ircular **D**ichroism)
- cAMP:** adenosina monofosfatada cíclica
- cDNA:** DNA complementar a um RNA mensageiro
- cGMP:** guanosina monofosfatada cíclica
- CK-2:** caseína quinase 2
- Da:** **D**alton(s), unidade de massa molecular
- dATP:** desoxiadenosina trifosfatada
- DEPC:** **D**i**E**til**P**iro**C**arbonato
- dNTPs:** desoxiribonucleotídeos trifosfatados
- D.O.x.:** **D**ensidade **Ó**ptica para um comprimento de onda de "x" nm

continua

continuação

EDTA:	ácido E tileno D iamino T etra A cético
FRE:	exosítio de reconhecimento do fibrinogênio (F ibrinogen R ecognition E xosite)
FVA:	enzima da peçonha de <i>Macrovipera lebetina</i> ativadora do fator V da coagulação
FUNASA:	F undação N acional de Saúde
GRAVY:	grande média de hidropaticidade
HPLC:	cromatografia líquida de alta performance (H igh P erformance L iquid C romatography)
IPTG:	Iso P ropil- β -D- T io G alactopiranosídeo
IUPAC:	União Internacional da Química Pura e Aplicada (I nternational U nion of P ure and A ppplied C hemistry)
kDa:	quiloDálton(s), unidade de massa molecular
KN-BJ2:	enzima liberadora de cininas da peçonha de <i>Bothrops jararaca</i>
LB:	meio de cultura L uria B ertani para bactérias
LM-TL:	enzima da peçonha de <i>Lachesis muta muta</i> com ação trombina-símile (<i>Lachesis muta muta</i> T hrombin- L ike enzyme)
NBT:	cloreto de nitroblue tetrazólio
NCBI:	Centro de Informações Biotecnológicas dos Estados Unidos (N ational C enter for B io t echnology I nformation)
nm:	nanômetros, unidade de medida correspondente a 10^{-9} metros
NMR:	Ressonância Magnética Nuclear (N uclear M agnetic R esonance), técnica aplicada para resolver estruturas 3D de proteínas purificadas
PAI:	inibidor do ativador do plasminogênio (P lasminogen A ctivator I nhibitor)
PAR:	receptores ativados por proteases (P rotease A ctivated R eceptors)
pb:	pares de b ases

continua

continuação

pBthaTL:	plasmídeo pET-28a contendo o cDNA relativo a BthaTL
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase (P olimerase C hain R eaction)
PDB:	banco de dados de estruturas tridimensionais (P rotein D atabase B ank)
.pdb:	formato de arquivos com informações tridimensionais
pl:	ponto isoelétrico
PITC:	fenilisotiocianato
PKC:	proteína quinase C
PMSF:	fluoreto de fenilmetilsulfonila, um inibidor de serinopeptidases
PPT:	precipitado
PTH:	feniltiohidantoína
PVDF:	fluoreto de polivinilideno
RNAses:	enzimas que degradam RNAs
RMS:	raiz quadrada média (R oot M ean S quare), parâmetro de comparação estrutural
rpm:	rotações por minuto
RT-PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase associada à ação da enzima Transcriptase Reversa (R everse T ranscriptase coupled with the P olimerase C hain R eaction)
RVV-Vα:	proteínase alfa da peçonha de <i>Vipera russelli</i> ativadora do fator V da coagulação
S1:	sobrenadante obtido em condições não desnaturantes após expressão heteróloga
S2:	sobrenadante obtido em condições desnaturantes após expressão heteróloga
SDS:	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE:	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
sp.:	espécie

continua

continuação

- SVTLEs:** enzimas de peçonhas ofídicas com ação semelhante à da trombina (**S**nake **V**enoms **T**hrombin-**L**ike **E**nzymes)
- Taq:** *Termophilus aquaticus*, espécie bacteriana resistente a altas temperaturas cuja DNA polimerase é utilizada para amplificação de cDNAs
- TBS:** solução tamponada com NaCl e Tris (**T**ris **B**uffered **S**aline)
- TF:** fator tissular ou fator III da coagulação sanguínea
- TFA:** ácido trifluoroacético
- tPA:** ativador tissular de plasminogênio (**t**issue **P**lasminogen **A**ctivator)
- TSV-PA:** enzima ativadora de plasminogênio da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* (**T**rimeresurus **s**tejnegeri **V**enom **P**lasminogen **A**ctivator)
- Tris:** Tris [hidroximetil] aminometano
- UFCs:** Unidades Formadoras de Colônias
- uPA:** ativador de plasminogênio tipo uroquinase (urokinase-type **P**lasminogen **A**ctivator)
- UPGMA:** **U**nweighted **P**air **G**roup **M**ethod with **A**rithmetic mean, método mais simples para a construção de árvores filogenéticas baseadas em similaridades fenotípicas
- X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo, substrato para a enzima β -galactosidase

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Reconstrução de sacro, pélvis e membro posterior da espécie <i>Pachyrhachis problematicus</i>	13
FIGURA 02: Representação esquemática de um membro posterior da espécie <i>Haasiophis terrasanctus</i>	14
FIGURA 03: Reconstrução de um indivíduo da espécie <i>Podophis descouensi</i>	14
FIGURA 04: Hipóteses sobre a filogenia dos esquamados	15
FIGURA 05: Esquema representando a vista lateral do esqueleto completo de um mosassauro.....	16
FIGURA 06: A bandeira mexicana e os símbolos farmacêutico e médico modernos são baseados em lendas sobre as serpentes	18
FIGURA 07: Distribuição das serpentes no mundo	20
FIGURA 08: Tipos de dentição encontrados em serpentes peçonhentas.....	21
FIGURA 09: Vistas lateral e superior das glândulas de peçonha de uma serpente solenóglifa	22
FIGURA 10: Representação esquemática dos processos ativos numa plaqueta que entra em contato com o tecido conectivo	24
FIGURA 11: Esquema da cascata de coagulação sangüínea de mamíferos	25
FIGURA 12: Estrutura do fibrinogênio	26
FIGURA 13: Reação de transamidação que liga os monômeros de fibrina	27
FIGURA 14: Polimerização da fibrina	28
FIGURA 15: Eletromicrografias do processo de coagulação	29
FIGURA 16: Estrutura tridimensional da LM-TL, uma serinopeptidase “trombina-símile” da peçonha de <i>Lachesis muta muta</i>	33
FIGURA 17: Ação de várias serinopeptidases de peçonhas ofídicas na hemostasia	35
FIGURA 18: Sítios envolvidos na catálise promovida pelas serinopeptidases	37
FIGURA 19: Esquema de uma árvore filogenética hipotética evidenciando quatro táxons evolutivamente relacionados	40
FIGURA 20: Modelagem molecular de proteínas por homologia	43

FIGURA 21: Exemplo de inconsistência da parcimônia em casos de ocorrência de táxons de evolução muito variada entre organismos	48
FIGURA 22: Exemplos de árvore ultramétrica e aditiva.....	49
FIGURA 23: Evolução simulada de duas seqüências a partir de um ancestral comum.....	50
FIGURA 24: Indivíduo adulto de <i>Bothrops alternatus</i> e área de incidência da espécie	74
FIGURA 25: Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do cDNA codificante da BthaTL, a partir do cDNA da Batroxobina.....	86
FIGURA 26: Mapa circular do vetor pGEM®-T Easy	90
FIGURA 27: Mapa circular do vetor pET-28a.....	93
FIGURA 28: Amostra de RNA total extraída da glândula de peçonha de uma serpente da espécie <i>Bothrops alternatus</i>	106
FIGURA 29: Análise do produto da RT-PCR.....	107
FIGURA 30: Análise do produto da PCR.....	108
FIGURA 31: Análise de restrição de uma colônia transformada	109
FIGURA 32: Análise de restrição de colônias da linhagem BL21(DE3) de <i>E. coli</i> transformadas com o vetor recombinante pBthaTL.....	110
FIGURA 33: Seqüenciamento do inserto no plasmídeo pBthaTL	111
FIGURA 34: Ensaio de expressão e solubilidade.....	113
FIGURA 35: Purificação da proteína recombinante	114
FIGURA 36: Imunodeteção da proteína recombinante BthaTL	115
FIGURA 37: Teste das atividades fibrinogenolítica e caseinolítica da BthaTL.....	116
FIGURA 38: Alinhamento da seqüência da BthaTL com diferentes SVTLEs e com as serinopeptidases “clássicas”	117-118
FIGURA 39: Procura por inserção ou deleção de motivos na seqüência primária da BthaTL	120
FIGURA 40: Alinhamento dos modelos moleculares da TSV-PA e da BthaTL.....	122
FIGURA 41: Modelo molecular da BthaTL	123
FIGURA 42: Posicionamento das pontes dissulfeto presentes no modelo molecular da BthaTL	124

FIGURA 43: Modelo de superfície com cargas da BthaTL.....	125
FIGURA 44: Alinhamento dos modelos moleculares da TSV-PA e da BthaTL mostrando resíduos importantes no reconhecimento do substrato	126
FIGURA 45: Resíduos de aminoácidos relevantes na especificidade da BthaTL por um substrato e em sua atividade.....	127
FIGURA 46: Resultados da avaliação do programa PROCHECK para a cadeia principal da TSV-PA.....	132
FIGURA 47: Resultados da avaliação do programa PROCHECK para a cadeia principal da BthaTL	133
FIGURA 48: Diagrama de Ramachandran resultante da avaliação do programa PROCHECK para a TSV-PA	134
FIGURA 49: Diagrama de Ramachandran resultante da avaliação do programa PROCHECK para a BthaTL	135
FIGURA 50: Árvores construídas a partir da reconstrução filogenética das seqüências de 12 serinopeptidases de peçonhas ofídicas, calicreína, tripsina e trombina usando o programa Phylip	136

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Tipos de toxinas de peçonhas ofídicas e seus mecanismos de ação no sistema hemostático de mamíferos	32
TABELA 02: Lista dos oligonucleotídeos utilizados no trabalho	77
TABELA 03: Lista das enzimas de restrição empregadas	77
TABELA 04: Seqüência dos 10 primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal e dos 18 nucleotídeos iniciais da região 3'UTR de algumas SVTLEs	85
TABELA 05: Componentes do kit empregado na síntese e amplificação inicial do cDNA de interesse	87
TABELA 06: Reação de reamplificação do provável cDNA codificante da proteína de interesse	88
TABELA 07: Porcentagem de identidade e de similaridade existente entre a BthaTL, algumas serinopeptidases de peçonhas ofídicas e as serinopeptidases "clássicas"	119
TABELA 08: Parâmetros físico-químicos estimados para a BthaTL.....	120
TABELA 09: Resultado da avaliação da TSV-PA pelo programa WHAT IF	129
TABELA 10: Resultado da avaliação da BthaTL pelo programa WHAT IF	130

RESUMO

Serinopeptidases de peçonhas ofídicas usualmente atuam sobre o sistema hemostático de mamíferos, algumas vezes mimetizando a ação da trombina, o que as torna objetos de interesse terapêutico contra a trombose. Neste trabalho descrevemos a clonagem, expressão em sistema bacteriano e purificação parcial da BthaTL, uma serinopeptidase recombinante com 233 resíduos de aminoácidos da peçonha de *Bothrops alternatus*. O cDNA codificante da proteína foi amplificado por uma Reação em Cadeia da Polimerase associada à ação da enzima Transcriptase Reversa, reamplificado por uma Reação em Cadeia da Polimerase e clonado no vetor pGEM-T Easy. Posteriormente, o cDNA foi subclonado no vetor de expressão pET-28a, originando o plasmídeo pBthaTL. Transformadas com o novo plasmídeo, as linhagens DH5- α e BL21(DE3) foram submetidas a ensaios de expressão, produzindo a proteína recombinante insolúvel na forma de corpos de inclusão. Visando sua solubilização, a BthaTL foi desnaturada, e re-enovelada *in vitro* para a recuperação da atividade enzimática. A ausência de atividade sobre o fibrinogênio e a caseína mostrou que o protocolo de re-enovelamento utilizado não foi efetivo. A sequência primária deduzida para a proteína evidenciou alto grau de identidade com serinopeptidases trombina-símile de peçonhas ofídicas, sendo aplicada na construção de um modelo molecular baseado na estrutura tridimensional da enzima ativadora de plasminogênio da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-PA). A substituição de alguns resíduos essenciais nas proximidades da fenda catalítica da BthaTL em relação ao molde indica que as duas proteínas não compartilham a mesma atividade ou especificidade. Experimentos teóricos de reconstrução filogenética corroboraram com a classificação das espécies de serpentes, agrupando as enzimas não viperídicas e as viperínicas em ramos independentes àqueles onde foram posicionadas as enzimas crotalínicas.

ABSTRACT

Snake venom serine proteinases usually act on the mammal hemostatic system, sometimes resembling the action of trombin, and these enzymes became objects of therapeutical interest against trombosis. In this work we describe the cloning, expression in bacterial system and partial purification of BthaTL, a recombinant serine peptidase with 233 amino acid residues from *Bothrops alternatus* venom. The cDNA encoding the protein was amplified by Polymerase Chain Reaction coupled with Transcriptase Reverse, reamplified by Polymerase Chain Reaction and cloned in the pGEM-T Easy vector. The cDNA was further subcloned into the pET-28a expression vector, originating pBthaTL plasmid. Transformed with the new plasmid, DH5- α and BL21(DE3) strains were been submitted to expression assays, producing the insoluble recombinant protein as inclusion bodies. Aiming its solubilization, BthaTL was denatured, and refolded *in vitro* for enzymatic activity recovery. The absence of activity upon fibrinogen and casein showed that the refolding protocol used was ineffective. The primary sequence deduced for the protein evidenced high degree of identity with snake venom thrombin-like serine peptidases, and it was used for the construction of a molecular model based in the three dimensional structure from *Trimeresurus stejnegeri* venom plasminogen activator (TSV-PA). The substitution of some essential residues in the neighborhoods of the BthaTL catalytic hole in relation to the template indicates that the two proteins do not share the same activity or specificity. Theoretical experiments of phylogenetic reconstruction had corroborated with the taxonomic classification of the snakes species, grouping the non-viperidic and viperinic enzymes in independent branches to those where the crotalinic enzymes had been located.

INTRODUÇÃO GERAL

TOXINAS OFÍDICAS E HEMOSTASIA

AS SERPENTES

CLASSIFICAÇÃO E ASPECTOS EVOLUTIVOS

O termo serpente vem do latim *serpen* + *antis*, e significa “rastejante”. A palavra ofídio deriva do grego *ophidion*, diminutivo de *ophis*, que também designa as serpentes (Dicionário Eletrônico Houaiss, 2001). No Brasil, estes animais são popularmente conhecidos como cobras.

As serpentes atuais são agrupadas, juntamente com lagartos e anfisbenas, na ordem Squamata, que integra a classe dos répteis (Uetz, 2003). Segundo Cundall & Greene (2000), elas são divididas em dois grupos principais: scolecófídeos (“cobras-cegas”, espécies cavadoras com bocas pequenas que se alimentam de presas menores, como formigas e cupins) e aletínofídeos (serpentes típicas que se alimentam de presas maiores, especialmente vertebrados). As características morfológicas observadas nas espécies viventes incluem pele escamada, língua profundamente bifurcada, alongação corporal, ausência de membros anterior e posterior, de pálpebras nos olhos e de ouvido externo.

Originadas há cerca de 135 milhões de anos, no período Cretáceo Inferior da Era Mesozóica, ainda hoje existem grandes dúvidas a respeito da ancestralidade das serpentes. O debate foi intensificado após a descoberta de três notáveis fósseis com aproximadamente 97 milhões de anos no Oriente Médio, todos dotados de membros posteriores (Coates & Ruta, 2000).

Um desses fósseis, representante da espécie nomeada como *Pachyrhachis problematicus*, foi encontrado em Israel e logo assumiu uma posição central nos debates sobre a filogenia do grupo (Lee & Caldwell, 1998). Ele possui pequenos membros posteriores, articulados com uma cintura pélvica rudimentar (Figura 01), mas suas patas não foram localizadas. No início, foi apontado como um parente aquático dos varanóides, cujas características morfológicas convergiriam com as das serpentes. Recentemente, foi reinterpretado como uma serpente verdadeira, graças

à sua articulação intramandibular, alongação corporal e estrutura das vértebras, além da condição de vários ossos cranianos e da ausência de membros anteriores e de cintura escapular (Zaher, 1998).

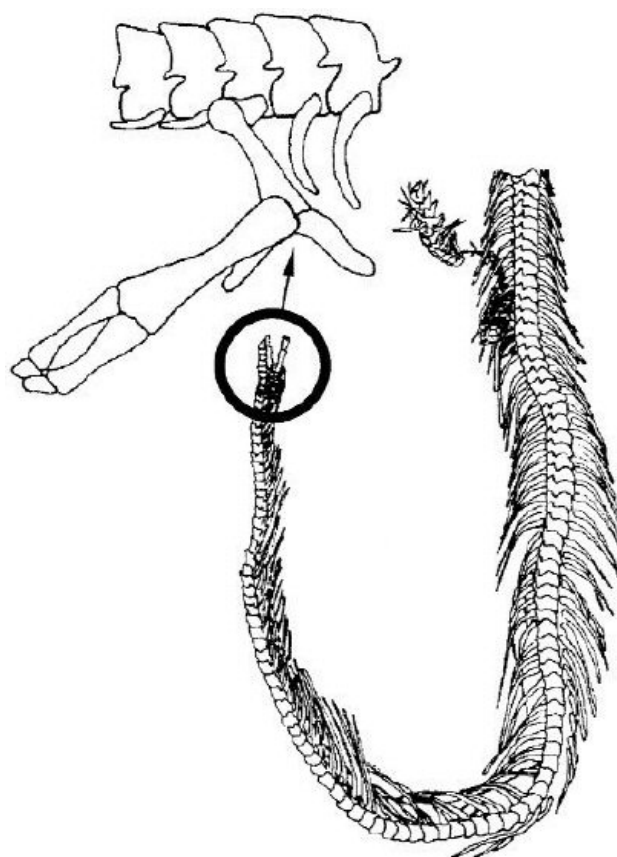


FIGURA 01 – Reconstrução de sacro, pélvis e membro posterior da espécie *Pachyrhachis problematicus*. O círculo indica a ampliação do membro posterior não totalmente preservado. Fonte: Coates & Ruta (2000).

Outra espécie fóssil encontrada em Israel, *Haasiophis terrasanctus* (Tchernov *et al.*, 2000), apresenta o mais conservado conjunto de membros posteriores entre as três espécies, mostrando pelo menos quatro dígitos remanescentes (Figura 02). Ela possui adaptações usualmente associadas com um estilo de vida aquático, como costelas e vértebras mais afinadas, além de uma cauda lateralmente comprimida.



FIGURA 02 – Representação esquemática de um membro posterior da espécie *Haasiophis terrasancus*, evidenciando resquícios de pelo menos quatro dígitos. Fonte: Coates & Ruta (2000).

Rage & Escuillié, no ano 2000, descreveram a espécie fóssil *Podophis descouensi*, do Líbano (Figura 03). Embora sua pélvis estivesse destruída, os ossos mais longos dos membros posteriores estavam bem preservados. A partir do tornozelo, entretanto, havia somente pequenos ossos espalhados.

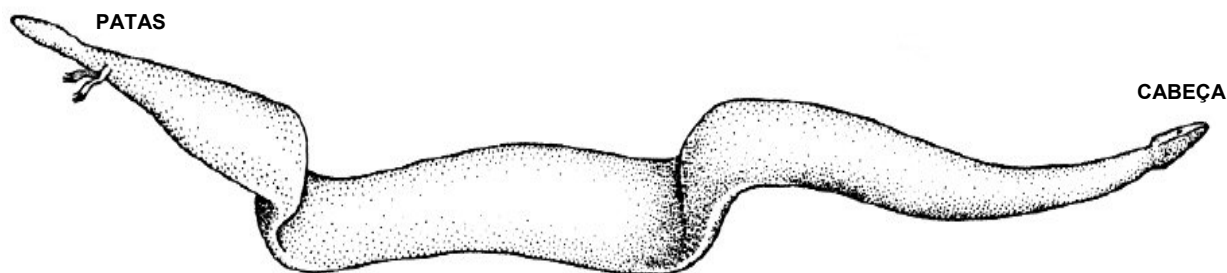


FIGURA 03 – Reconstrução de um indivíduo da espécie *Podophis descouensi*. Figura retirada de Coates & Ruta (2000).

Duas hipóteses que tentam explicar o modo de vida ancestral das serpentes têm sido bastante discutidas.

Em 1940, Walls propôs a hipótese terrestre, segundo a qual as características que definem as serpentes foram adquiridas por ancestrais fossoriais (cavadores). A ausência ou redução radical de membros, ocorrida com as serpentes e outros esquamados como anfisbenas e dibamídeos, é apontada como uma evidência para esta proposta (Zaher & Rieppel, 2000; Kearney, 2003). Coates & Ruta (2000) observaram que as características compartilhadas pelos três grupos também incluem a redução e consolidação de ossos cranianos (originando uma proteção para o cérebro), redução ou desaparecimento da cintura pélvica, e uma uniformidade crescente ao longo da coluna vertebral.

De acordo com esta hipótese, as serpentes marinhas fósseis (paquiófídeos) seriam derivadas dos aletinofídeos, não tendo participação na origem do grupo (Figura 04B). Isto implicaria numa re-evolução de membros ou em várias perdas independentes de membros nas linhagens de serpentes viventes (Rieppel *et al.*, 2003), tendência comum durante a evolução de outros vertebrados, especialmente da ordem Squamata (Greer, 1991).

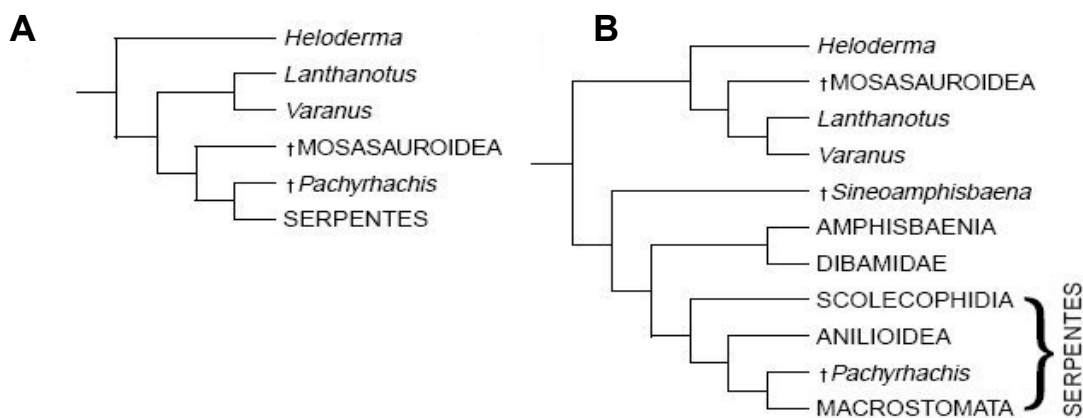


FIGURA 04 – Hipóteses sobre a filogenia dos esquamados. (A) Modelo proposto por Lee, em 1997, defendendo a hipótese marinha para a origem das serpentes. (B) Modelo de Rieppel & Zaher, publicado em 2000, sobre a hipótese terrestre. Esquemas retirados de Vidal & Hedges (2004).

A hipótese marinha, defendida por Lee & Caldwell (2000) e esquematizada na Figura 04A, afirma que as serpentes seriam derivadas dos varanóides, um grupo que inclui várias famílias de répteis marinhos extintos (como os mosassauros, que compartilham com as serpentes características morfológicas cranianas e maxilares, além da dentição) e duas famílias viventes de lagartos terrestres, os helodermatídeos (gênero *Heloderma*) e os varanídeos (gêneros *Lanthanotus* e *Varanus*).

Segundo esta hipótese, os extintos paquiófídeos marinhos seriam intermediários entre os esquamados marinhos dotados de membros (mosassauros, mostrados na Figura 05) e as serpentes atuais (Lee & Scanlon, 2002), sendo os lagartos varanídeos seus parentes vivos mais próximos. Forstner, em 1995, por meio da análise de genes mitocondriais, obteve dados que apóiam esta proposta.

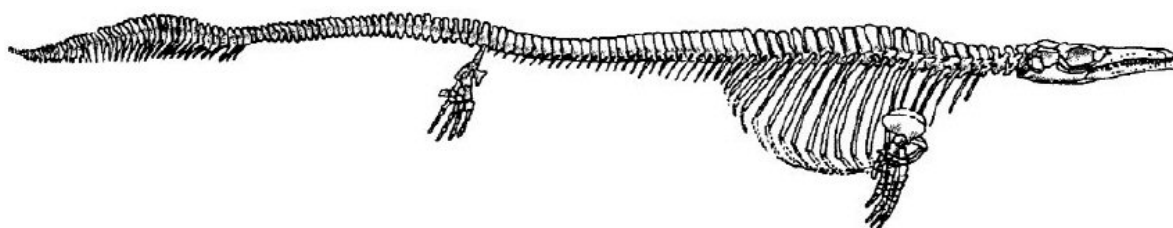


FIGURA 05 – Esquema representando a vista lateral do esqueleto completo de um mosassauro. Retirado de Coates & Ruta (2000).

A posição basal de ambos os grupos de esquamados marinhos implicaria numa transição do ambiente marinho para o terrestre, levando às serpentes atuais, um evento sem precedentes na história conhecida dos tetrápodos.

MITOS E VERDADES

Os povos primitivos, por não terem conhecimento suficiente para explicar determinados fatos por eles observados, simplesmente os respeitavam, atribuindo-lhes poderes sobrenaturais e rendendo a eles muitas homenagens e tributos.

Estes fatos, inicialmente transmitidos pela tradição oral, refletiam o modo de pensar e de agir em diferentes épocas e lugares, e permitiram a criação de mitos, lendas, superstições e crenças, muitas das quais sobrevivem até os nossos dias.

A literatura mostra que existem pontos comuns entre mitos que perduram em culturas distintas. Exemplos claros disso são a história do Dilúvio, a vida após a morte, a saga de alguns heróis e também o amplo universo das serpentes, que desde tempos imemoriais exercem um grande fascínio sobre o homem (Vizotto, 2003).

Asco, veneração, pânico, curiosidade. São muitas as sensações que podem envolver uma pessoa ao se deparar com uma cobra, exceto a indiferença. As serpentes são animais interessantes, e do mesmo modo que causam fascínio podem causar repulsa. Muitas são as histórias criadas em torno delas, geralmente em função da interpretação errada dos fatos observados e da conversa de boca em boca. No entanto, poucas dessas histórias possuem fundamento. A repulsa para com estes animais parece ser tão antiga quanto a própria História da humanidade.

Devido às suas características anatômicas e ao seu comportamento biológico, várias simbologias têm sido a elas atribuídas (Vizotto, 2003). Determinadas culturas enxergavam as serpentes como poderosos símbolos religiosos. Quetzalcoatl, a serpente emplumada mítica representada na bandeira mexicana (Figura 06A), era definida como a “Mestra da Vida” pelos antigos astecas da América Central.

Certos povos africanos adoravam pítons de pedra, considerando a morte de uma dessas serpentes um crime sério e passível de severas punições. Na Austrália, os aborígenes associavam as serpentes com a criação da vida.

Outras culturas relacionavam os ofídios com poderes medicinais e mesmo com o renascimento. Na Índia, as najas foram consideradas reencarnações de pessoas importantes chamadas Nagas.

Os símbolos médico (Figura 06B) e farmacêutico (Figura 06C) modernos vêm da mitologia grega antiga. De acordo com os gregos, a figura mítica Esculápio (ou Asclépio) descobriu os medicamentos ao assistir uma serpente utilizando ervas para devolver outra serpente à vida.



FIGURA 06 – A bandeira mexicana (A) e os símbolos farmacêutico (B) e médico (C) modernos são baseados em lendas sobre as serpentes.

A cultura cristã foi menos generosa com os ofídios. Os contos do Jardim do Edén contribuíram para criar uma imagem negativa desses animais na civilização ocidental. Em Appalachia (EUA), alguns cristãos utilizam serpentes peçonhentas como parte das cerimônias religiosas e confiam unicamente na fé para protegê-los de eventuais picadas. Entre os católicos, São Patrício é celebrado por ter libertado a Irlanda da ameaça representada pelas serpentes.

Preconceitos culturais profundamente arraigados são responsáveis, em parte, pelo medo difundido e pelo desprezo a este grupo de répteis. Os mitos modernos, influenciados pelas lendas e exagerados em função do grande número de acidentes ofídicos em todo o planeta, inclusive no Brasil, elevam o temor geral.

A Organização Mundial de Saúde calcula que ocorram 2.500.000 acidentes ofídicos por ano, com uma média de 125 mil mortes (Pinho *et al.*, 2004). Estes acidentes acontecem com muita frequência em regiões tropicais e neotropicais e constituem um problema de Saúde Pública dada a incidência, a gravidade e as seqüelas deixadas nas vítimas (Barravieira, 1991). A mortalidade é maior na Ásia e na África. No Brasil, o Ministério da Saúde contabiliza 20 mil acidentes ofídicos por ano, com uma média de 120 vítimas fatais (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos da FUNASA, 2001).

A ocorrência do acidente ofídico está, em geral, relacionada a fatores climáticos (o verão, quente e chuvoso, é a época de maior ocorrência) e ao aumento da atividade humana no campo (as picadas ocorrem principalmente das 6 às 18 horas, período ativo dos agricultores). A faixa etária mais acometida varia de 15 a 49 anos, sendo prevalente o sexo masculino. Nos membros inferiores, o pé e a perna são os locais mais atingidos. Já nos anteriores, as mãos e o antebraço são mais afetados (Pinho & Pereira, 2001).

Na realidade, as serpentes não têm o interesse de atacar uma pessoa, e quando o fazem, é para a sua própria defesa. Muitas são inofensivas ao homem, e nenhuma espécie peçonhenta se aproxima deliberadamente de alguém para picar. São as pessoas que não percebem a presença do animal e se aproximam dele, fazendo-o se sentir ameaçado. Longe de serem cruéis, as serpentes desempenham um papel ecológico essencial, alimentando-se de animais nocivos como ratos e outros roedores que atacam grãos estocados e são vetores de doenças graves. Infelizmente, essas eficientes predadoras vêm sofrendo há tempos uma drástica redução em suas populações devido aos medos infundados que, juntamente com a destruição dos habitats naturais, ameaçam sua sobrevivência.

Segundo um levantamento recente apresentado no site do Instituto Butantan (www.butantan.gov.br), existem hoje cerca de 2.700 espécies de serpentes em todo o planeta, distribuídas em 11 famílias, habitando os mais diversos lugares, das selvas equatoriais aos desertos, não sendo encontradas nos pólos, regiões montanhosas muito altas e frias e em algumas ilhas (Figura 07).

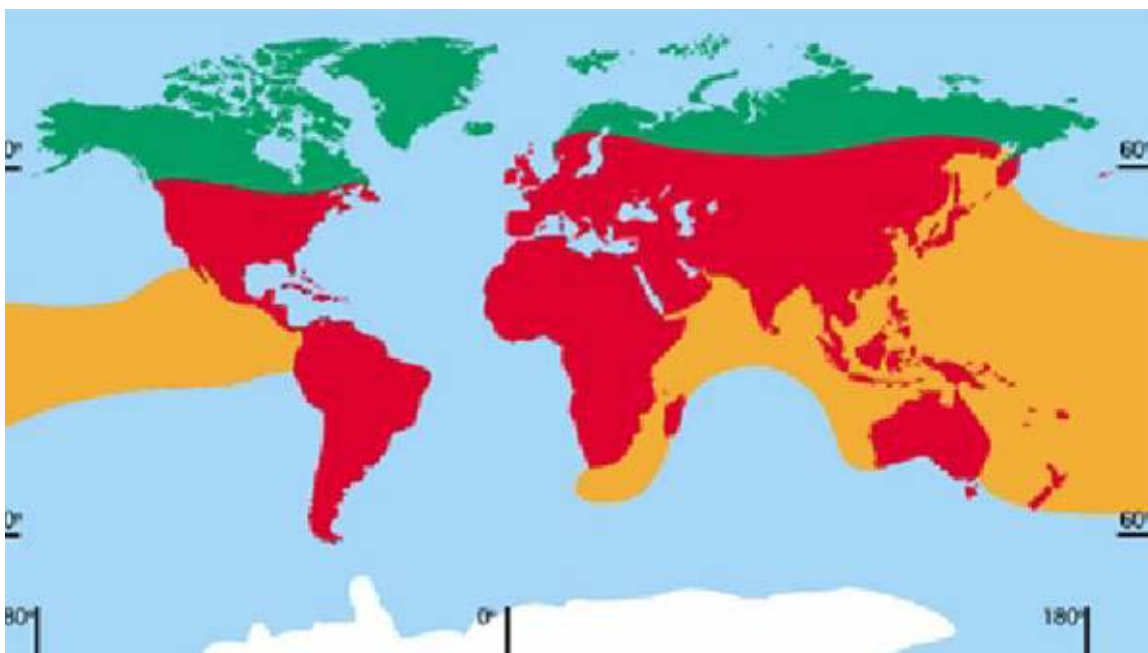


FIGURA 07 – Distribuição das serpentes no mundo. A cor vermelha indica as áreas de maior incidência das espécies terrestres, e a alaranjada, das espécies marinhas. As áreas em verde apresentam menor proporção de espécies terrestres.

Fonte: www.butantan.gov.br. Acesso em 10/08/2002.

No Brasil, são conhecidas aproximadamente 260 espécies pertencentes a 9 famílias. Elas podem ser vistas de norte a sul, nas árvores, no solo, nos rios, lagoas e até no mar, onde algumas gostam de pescar.

Romano-Hoge, no ano 2000, determinou que há 4 famílias principais em território brasileiro: Colubridae (189 espécies), Boidae (10 *sp.*), Viperidae (22 *sp.*) e Elapidae (18 *sp.*). Segundo o relatório mais recente da Fundação Nacional de Saúde, divulgado em 2001, os gêneros de serpentes peçonhentas que mais preocupam a Saúde Pública são *Bothrops* (as jararacas, causadoras de 90,5% dos acidentes ofídicos registrados anualmente no país), *Crotalus* (cascavéis, 7,7%) e *Lachesis* (surucucus, 1,4%), todos pertencentes à família Viperidae, e o gênero *Micrurus* (corais, 0,4%), integrante da família Elapidae.

PEÇONHAS OFÍDICAS: OCORRÊNCIA, SÍNTESE, COMPOSIÇÃO E VARIABILIDADE

Frey Vogel & Perret (1973) definiram as serpentes peçonhentas como aquelas que produzem substâncias tóxicas para outros organismos em glândulas bucais modificadas e que inoculam essas toxinas na vítima por meio de dentes canaliculados, as presas, localizadas na maxila e ligadas à glândula por um ducto.

As serpentes da família Viperidae possuem uma dentição denominada solenóglifa (do grego *solenos*, móvel, e *glifos*, canal) (Figura 08A), caracterizada por presas canaliculadas e curvadas para dentro, na porção anterior da maxila, que se projetam para fora no momento do ataque. Tal especialização garante a essa família de serpentes peçonhentas maior eficiência na inoculação da peçonha. Já as serpentes da família Elapidae são proteróglifas (do grego *protero*, anterior, e *glifos*, canal) (Figura 08B), possuindo um par de dentes pequenos, bem sulcados e fixos na porção anterior da boca, os quais limitam a injeção da peçonha.

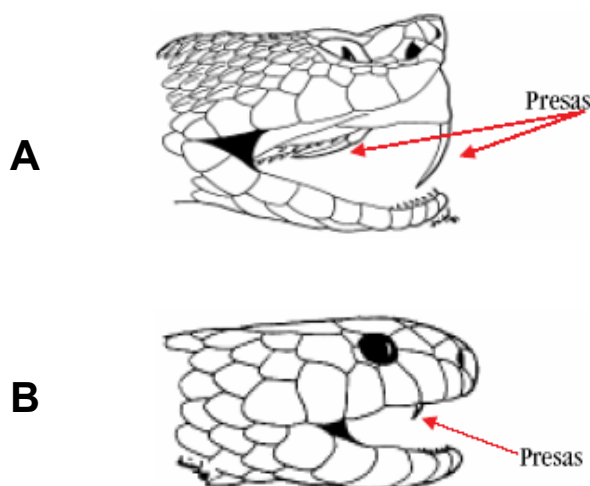


FIGURA 08 – Tipos de dentição encontrados em serpentes peçonhentas. Em (A), dentição solenóglifa da família Viperidae, que permite a injeção direta da peçonha na vítima. Em (B), dentição proteróglifa da família Elapidae, menos eficiente na inoculação peçonha (imagens retiradas do Manual da FUNASA, 2001).

As glândulas de peçonha das serpentes derivam das glândulas salivares e estão localizadas atrás dos olhos, na maxila superior (Figura 09). Elas constituem tecidos extremamente especializados em produzir e armazenar proteínas, secretando-as por meio de contrações musculares no instante da picada. Os mecanismos celulares de regulação da produção e secreção de proteínas neste órgão são desconhecidos. Sabe-se que a produção da peçonha depende dos níveis protéicos armazenados no lúmen glandular. Como a proporção de grânulos secretores nas células glandulares representa 4% do volume celular, fica claro que a síntese e a secreção das toxinas constituem processos rápidos (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002).

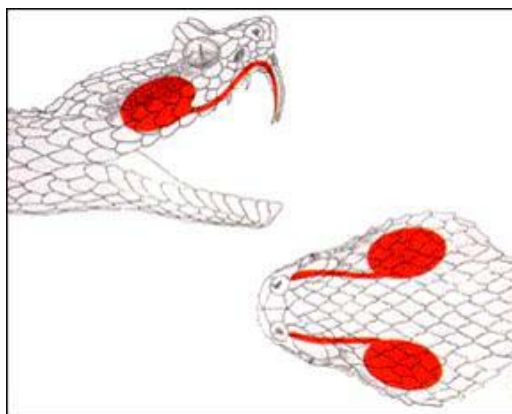


FIGURA 09 – Vistas lateral e superior das glândulas de peçonha de uma serpente solenóglifa.

Fonte: <http://www.zoobooks.com/newFrontPage/animals/virtualZoo/animals/s/snakes/venomsacks.html>, 29/11/2004.

As peçonhas, que originalmente eram substâncias digestivas, foram acrescidas de novos componentes, como peptídeos farmacologicamente ativos e enzimas indutoras de uma variedade imensa de efeitos (Francischetti *et al.*, 1998), além de toxinas não enzimáticas e uma porção não protéica representada por íons metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas, lipídeos e aminoácidos livres (Markland, 1998a), tornando-se uma importante ferramenta não só para a apreensão e digestão do alimento, como também para a defesa.

Sua composição difere de um indivíduo para outro, sejam eles da mesma espécie ou de espécies distintas. Na Antigüidade, a variação era atribuída a fatores exógenos. Aristóteles, na obra “De Historia Animalium”, hipotetizou que as peçonhas das víboras do norte da África eram mais letais do que as da Grécia por causa do calor (Chippaux *et al.*, 1991).

Sabe-se hoje que, além dos fatores climáticos, a variabilidade na composição das peçonhas se deve a variações genéticas (Daltry *et al.*, 1996; Monteiro *et al.*, 1997; Magrin *et al.*, 2002), etárias (Gutiérrez *et al.*, 1980; Pe *et al.*, 1995; Saldarriaga, *et al.*, 2003), geográficas (Cavinato *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 1998) e alimentares (Magalhaes *et al.*, 2003).

O PROCESSO DE COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA

Quando ocorre um ferimento acidental ou intencional, os vasos sangüíneos da pele são rompidos, estabelecendo-se o sangramento. A perda de sangue pelos vasos danificados seria fatal se não houvesse um sofisticado mecanismo de reparo (hemostasia) caracterizado por três etapas que acontecem quase simultaneamente:

Espasmo do endotélio vascular: logo após o corte, há uma contração da musculatura lisa na região afetada do vaso, objetivando a diminuição da área de escape do sangue. Essa ação reflexa não é suficiente para controlar o sangramento, e a contração inicial dura até que se forme o “tampão plaquetário”, quando as plaquetas secretam serotonina, evitando o relaxamento muscular.

Formação do “tampão plaquetário”: com a ruptura do vaso sangüíneo, as plaquetas discóides circulantes no sangue extravasam, e passam a interagir com proteínas subendoteliais como o colágeno, fibronectina e vitronectina por meio de suas glicoproteínas de membrana Ib, V e IX, e pelo complexo de glicoproteínas Ia/IIa da membrana plaquetária. A ativação das plaquetas é iniciada por agonistas solúveis como trombina e ácido aracdônico (AA). As células então mudam de aspecto e liberam serotonina, ADP e tromboxanas A₂, que atraem outras plaquetas para a região ferida.

A agregação plaquetária se inicia, mediada por complexos formados pela associação de glicoproteínas da membrana das plaquetas (IIb) com integrinas (IIIa) ligados ao fibrinogênio ou ao fator de Von Willebrand (Figura 10).

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

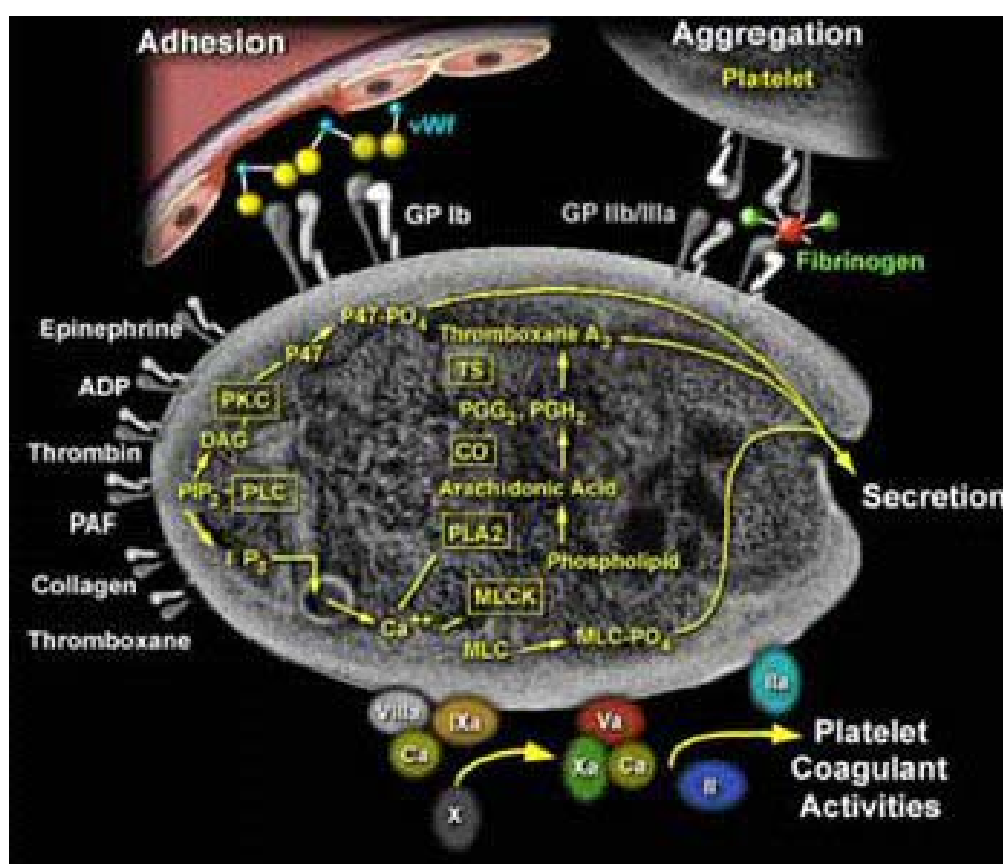


FIGURA 10 – Representação esquemática dos processos ativos (adesão, agregação e secreção) numa plaqueta que entra em contato com o tecido conectivo.

Coagulação do sangue: ocorre por meio de algumas reações químicas que culminam na conversão do fibrinogênio, uma proteína plasmática solúvel, numa rede insolúvel de fibrina que interage com as plaquetas aderidas ao tampão plaquetário, estabilizando-as e formando o coágulo. Nos mamíferos, a coagulação pode ocorrer por duas vias interligadas: a via intrínseca e a via extrínseca (Figura 11).

A via extrínseca é ativada no momento do corte. Fibroblastos e macrófagos dos tecidos irrigados pelos vasos rompidos produzem o TF (fator tissular ou fator III da coagulação) que se liga ao fator VII ativado, formando o complexo TF-VIIa. Na presença de cálcio, este ativa os fatores IX e X (Camerer *et al.*, 1996).

Já a via intrínseca, também denominada sistema de contato, é ativada no instante em que o sangue extravasa em função do corte, interagindo com superfícies adequadas e negativamente carregadas, como é o caso das fibras de colágeno. O fator XII é então ativado na presença da pré-caliceína plasmática e do cininogênio de alto peso molecular, e com o auxílio destes cliva o fator XI, levando à ativação do fator IX e, posteriormente, do fator X (Colman & Schmaier, 1997).

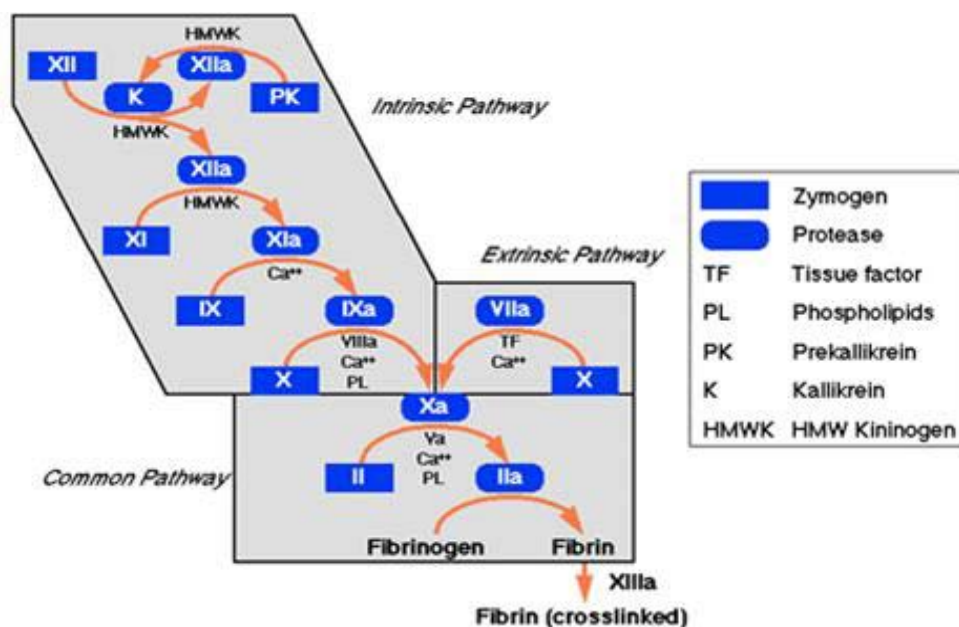


FIGURA 11 – Esquema da cascata de coagulação sangüínea de mamíferos.

É importante observar que os fatores IX e X são ativados quando em contato com os fosfolípidos da membrana das plaquetas (Figura 10).

Após a formação do fator Xa, as duas vias convergem para a ativação da pró-trombina (fator II). A trombina resultante é constituída por duas cadeias, A e B, ligadas por uma ponte dissulfeto. A cadeia B é homóloga à tripsina, desempenhando papéis importantes: ativação dos fatores VIII e V (cofatores, em ordem, dos fatores IX e X), do fator XI (via independente do sistema de contato) e do fator XIII (responsável pela formação das ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina, ver Figura 14), além de atuar nas plaquetas (com as quais interage pelos receptores PAR-1 e PAR-4) e converter o fibrinogênio em monômeros de fibrina pela clivagem dos fibrinopeptídeos A e B, formados, respectivamente, por 16 e 14 resíduos de aminoácidos (Figura 12). Os fibrinopeptídeos A e B contêm vários resíduos de aspartato e glutamato que lhes atribuem carga negativa, aumentando a solubilidade da proteína. A trombina cliva as ligações peptídicas entre resíduos N-terminais de arginina e, na maioria dos animais, glicina nas cadeias A α e B β , liberando os fibrinopeptídeos e tornando a molécula resultante insolúvel.



FIGURA 12 – Estrutura do fibrinogênio (fator I da coagulação), proteína plasmática dimérica formada por três pares de cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto.

As moléculas insolúveis formadas pela clivagem do fibrinogênio sofrem a ação do fator XIII ativado, uma transglutaminase altamente específica que introduz ligações covalentes cruzadas entre o nitrogênio do grupo amida de glutaminas e o grupo ϵ -amino de lisinas presentes nos monômeros de fibrina, conforme mostrado na figura abaixo.

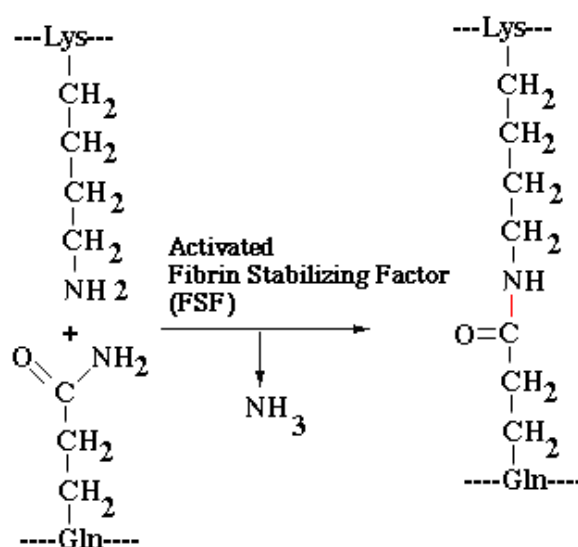


FIGURA 13 – A reação de transamidação que liga os monômeros de fibrina, formando coágulos estáveis, é catalisada pelo fator estabilizador de fibrina ativado (FSF ou FXIIIa).

Fonte: <http://ntri.tamuk.edu/homepage-ntri/lectures/clotting.html>. Acesso em 12/11/2004.

A formação de coágulos estáveis é essencial para a regeneração da área ferida. Inicialmente, são formadas ligações cruzadas entre resíduos da região C-terminal das cadeias γ de monômeros adjacentes de fibrina. Posteriormente, vários outros resíduos vão sendo ligados por intermédio do fator XIIIa, aumentando a resistência do coágulo (Figura 14).

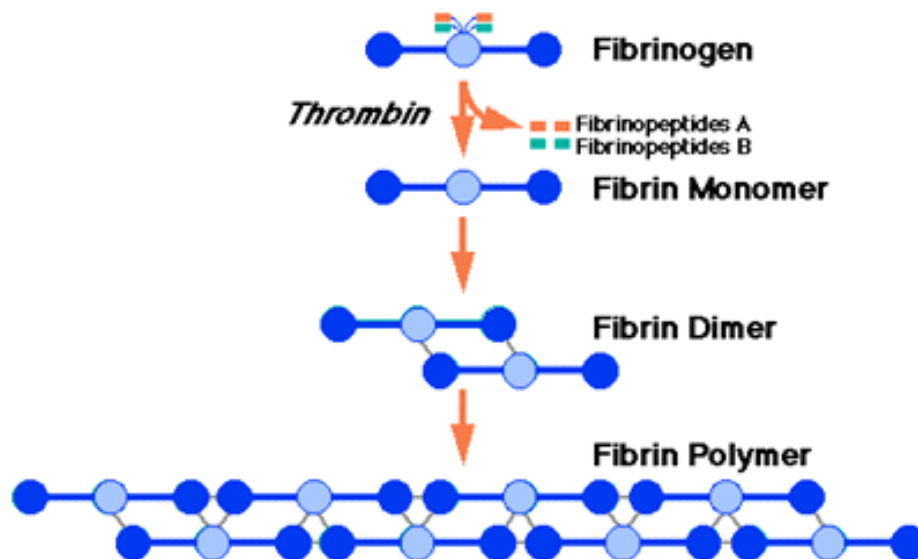


FIGURA 14 – Polimerização da fibrina, resultante das reações de transamidação entre os radicais laterais de resíduos básicos das cadeias α , β e γ .

Fonte: <http://tollefsen.wustl.edu/projects/coagulation/coagulation.html>. Acesso em 12/11/2004.

A formação descontrolada de trombos (coágulos) no organismo poderia culminar em morte. Para evitar esse destino, a coagulação é regulada de diferentes maneiras. A trombina pode se ligar a trombomodulina, uma glicoproteína endotelial, formando um complexo que ativa a proteína C, a qual degrada os cofatores V e VIII, interrompendo a ativação da pró-trombina. Inibidores circulantes como TFPI e antitrombina II atuam sobre outros fatores da coagulação, impedindo que o coágulo se espalhe para a periferia do tecido danificado (Bauer & Rosenberg, 1991). Finalmente, a fibrinólise é inibida dentro do coágulo pela ativação do inibidor da fibrinólise dependente de trombina, que remove os resíduos C-terminais de lisina da fibrina, impedindo o reconhecimento da mesma pela plasmina e a degradação do coágulo (Von Dem Borne *et al.*, 1997).

Formado o coágulo, que reúne as plaquetas aderidas ao tecido conectivo e agregadas entre si, a rede de fibrina, além de hemácias e leucócitos (Figura 15), as células endoteliais começam a proliferar, reocupando a área ferida.

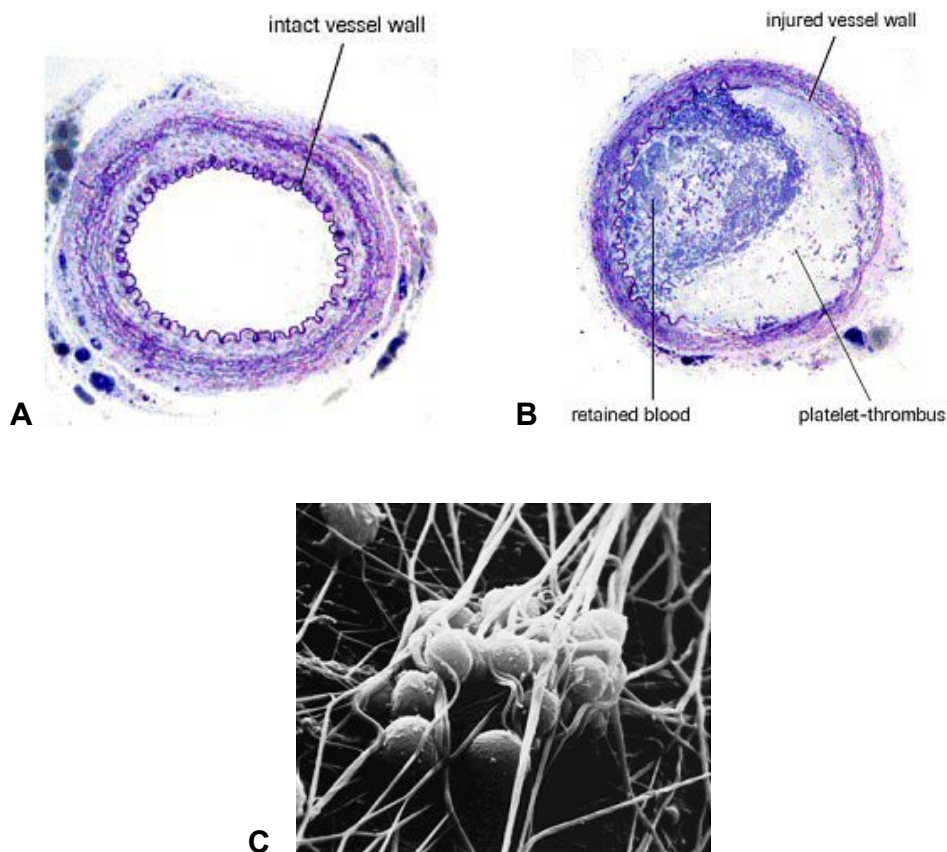


FIGURA 15 – Eletromicrografias do processo de coagulação. Em (A), observa-se um vaso sangüíneo intacto. Em (B), o mesmo vaso apresenta-se lesado e parcialmente ocupado pelo coágulo ou trombo. Em (C), vê-se uma eletromicrografia do coágulo.

Fonte: www. Roche.com/pages/facets/8/anticoae.htm. Acesso em 07/11/2004.

Uma vez caracterizado o processo de cicatrização, o coágulo deve ser dissolvido, para liberar o fluxo sangüíneo. A permanência do coágulo pode culminar em seu espalhamento pelo organismo, obstruindo acidentalmente uma veia ou uma artéria.

A fibrinólise é iniciada pela conversão do plasminogênio em plasmina, promovida pelo ativador de plasminogênio tissular (tPA) e pelo ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), duas proteínas liberadas pelas células endoteliais (Mayer, 1990). A atividade do plasminogênio pode ser atenuada pelo inibidor de ativação do plasminogênio 1 (PAI-1), e a da plasmina é regulada por inibidores como a α 2-antiplasmina e a α 2-macroglobulina (Anonick *et al.*, 1990).

As ligações covalentes mais expostas da fibrina polimerizada são facilmente degradadas pela plasmina, que graças à estrutura relativamente aberta do coágulo acessa facilmente o seu alvo. Os produtos da clivagem são eliminados via urina.

Fantl, em 1961, afirmou que cascatas de coagulação existem em outros vertebrados além dos mamíferos. Enquanto a via extrínseca está presente também em peixes, anfíbios, répteis e aves, curiosamente a via intrínseca é muito fraca ou está ausente em répteis (em especial nas serpentes peçonhentas) e aves, cujos sistemas de coagulação aparentam ser menos complexos.

A ausência da via intrínseca pode ser justificada por deficiências na síntese do fator XII, baixas concentrações dos fatores VIII e IX, e também pela ocorrência de inibidores da coagulação no plasma sanguíneo das serpentes (Smith *et al.*, 2000).

DESORDENS DA COAGULAÇÃO

Ariëns *et al.* (2002) relataram que condições clínicas associadas com o desenvolvimento da trombose são a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo desenvolvido. Entre elas estão as desordens aterotrombóticas (infarto do miocárdio, doença cerebrovascular isquêmica e doenças vasculares periféricas) e as desordens trombóticas venosas (embolia pulmonar e trombose profunda das veias). O desenvolvimento de tais desordens geralmente leva muitas décadas e envolve a interação de fatores de risco aterogênicos (diabetes, dislipidemia, hipertensão, etc.) com anormalidades do sistema hemostático.

Doenças arteriais evoluem em sistemas de alta pressão e deposição de lipídeos, culminando com a hiperplasia da musculatura lisa e levando à formação, por exemplo, do ateroma coronário. Em idades mais avançadas, as placas se tornam instáveis e se rompem, formando êmbolos que ativam a via extrínseca da coagulação, iniciando uma série de eventos que levarão à oclusão trombótica das artérias coronárias (Ariëns *et al.*, 2002).

O infarto do miocárdio resulta do desenvolvimento de um coágulo de fibrina rico em plaquetas e resistente a fibrinólise. A trombose venosa ocorre classicamente em indivíduos com pré-disposição genética (por exemplo, deficiências na síntese da proteína C ou da antitrombina III), sendo reduzida em número de plaquetas se comparada com uma doença arterial, e composta principalmente por polímeros de fibrina (Ariëns *et al.*, 2002).

SERINOPEPTIDASES DE PEÇONHAS OFÍDICAS COM AÇÃO SIMILAR À DA TROMBINA

Markland (1998a) relatou que o primeiro registro conhecido da atividade coagulante das peçonhas ofídicas data do final do século XVIII, quando o italiano Fontana injetou a peçonha de uma víbora na veia jugular de alguns coelhos, observando que o sangue dos animais coagulava rapidamente, levando-os à morte. No século XIX, Mitchell & Reichert estudaram os efeitos de algumas peçonhas ofídicas, fazendo uma série de registros sobre suas atividades coagulante e anticoagulante.

As peçonhas ofídicas vêm sendo intensamente estudadas desde o início do século XX, quando foi comprovado que muitas delas atuavam sobre o sangue das vítimas. Entretanto, dada a limitação dos recursos científicos disponíveis na época, somente nos anos 50 a primeira peptidase com atividade coagulante foi purificada (Matsui *et al.*, 2000). De acordo com sua estrutura, essas proteínas são classificadas como serino e metalopeptidases. Há evidências fracas ou indiretas da presença de tiol e de aspártico peptidases nas peçonhas.

Algumas peptidases parecem atuar no local da picada de forma inespecífica para imobilizar as vítimas. Outras, entretanto, clivam apenas proteínas plasmáticas, de forma específica, apresentando potentes efeitos como ativadoras ou inibidoras nos processos de hemostasia e de trombose, incluindo a coagulação sangüínea, a fibrinólise e a agregação plaquetária (Tu, 1996).

Mais de 150 peptidases de peçonhas ofídicas já foram total ou parcialmente purificadas e funcionalmente caracterizadas desde os anos 50. A estrutura primária completa de mais de 40 delas foi determinada por seqüenciamento protéico ou deduzida a partir dos nucleotídeos presentes em seu cDNA. Nos últimos 5 anos muitos estudos, incluindo a clonagem molecular, têm levado à identificação de um número crescente de seqüências (Castro *et al.*, 2004). Já o entendimento da relação estrutura-função, especialmente de metalo e serinopeptidases purificadas, tem melhorado bastante devido às análises cristalográficas por raios-X.

Dentre as diversas proteínas pró e anticoagulantes que interferem na hemostasia de mamíferos, interagindo com proteínas da cascata de coagulação sangüínea e da via fibrino(geno)lítica e sendo agrupadas de acordo com suas funções (Tabela 01), destacam-se aquelas encontradas nas peçonhas de serpentes das subfamílias Crotalinae e Viperinae (Hutton & Warrell, 1993). Paradoxalmente, essas enzimas com ação trombina-símile apresentam atividade coagulante *in vitro* e anticoagulante *in vivo*, o que gerou muitas confusões na classificação das peçonhas como coagulantes ou anticoagulantes (Rosenfeld *et al.*, 1968).

TABELA 01 – Tipos de toxinas de peçonhas ofídicas e seus mecanismos de ação no sistema hemostático de mamíferos. Modificada de Hutton & Warrell (1993).

PROCOAGULANTES	ANTICOAGULANTES	FIBRINÓLISE	PLAQUETAS
Coagulação do fibrinogênio Ativação da pró-trombina Ativação do fator X Ativação do fator V	Ativação da proteína C Ativação da antitrombina II Desnaturação do fator V	Degradação do fibrinogênio Ativação do plasminogênio	Agregação Inibição da agregação

O tipo mais comum de toxina ofídica pró-coagulante atua sobre o fibrinogênio, predominando nas peçonhas das serpentes da família Viperidae. Grande parte dessas toxinas pertence ao grupo das serinopeptidases com o enovelamento típico da enzima digestiva quimiotripsina, caracterizado pela presença de dois domínios assimétricos de folhas β , separados pela tríade catalítica (Lesk & Fordham, 1996), composta pela serina 195 da região C-terminal, além da histidina 57 e do aspartato 102 da região N-terminal, conforme a numeração do quimiotripsinogênio (Meloun *et al.*, 1966; Bode *et al.*, 1992) (Figura 16).

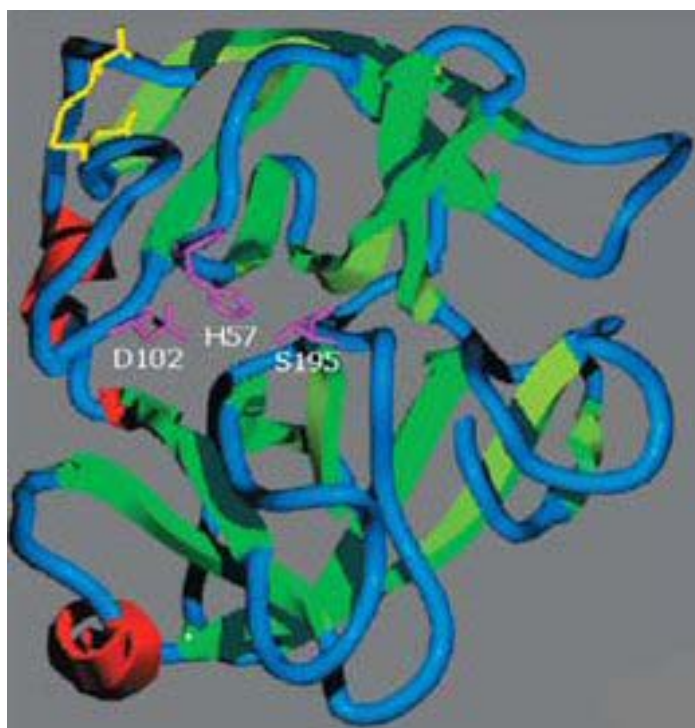


FIGURA 16 – Estrutura tridimensional da LM-TL, uma serinopeptidase “trombina-símile” da peçonha de *Lachesis muta muta* (Castro *et al.*, 2001). O enovelamento típico da família da quimiotripsina e o posicionamento espacial da tríade catalítica (His57, Asp102 e Ser195, em roxo) são evidentes. Regiões de enovelamento ao acaso são apresentadas em azul, as α hélices em vermelho e as folhas β em verde.

Serinopeptidases podem representar até 20% do conteúdo protéico total das peçonhas de serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae. Elas não são letais por si próprias, mas contribuem nos efeitos tóxicos do envenenamento (Wisner *et al.*, 2001).

Embora a maioria dessas toxinas clive apenas o fibrinopeptídeo A ou o B do fibrinogênio, não ative o fator XIII e nem sempre seja suscetível aos inibidores conhecidos da trombina, elas são comumente denominadas “trombina-símile” por sua ação semelhante à da trombina (Stocker *et al.*, 1982). A não formação das ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina resulta em coágulos aberrantes, mais frágeis e translúcidos, dissolvidos independentemente da ativação da plasmina (Markland, 1998b).

Como exemplo de fibrinogenases A, podem ser citadas a Batroxobina (Itoh *et al.*, 1987) e a Flavoxobina (Kawabata *et al.*, 1988). A Mucofirase V (Hung *et al.*, 1994) é um exemplo de fibrinogenase B.

Em alguns casos, uma única serinopeptidase da peçonha pode desempenhar mais de uma função. A Bothrombina (Nishida *et al.*, 1994), além de clivar o fibrinopeptídeo A, promove agregação plaquetária e ativa o fator XIII da coagulação. A KN-BJ2 (Serrano *et al.*, 1998) cliva o fibrinopeptídeo A e libera bradicininas hipotensoras. A proteína Ancrod (Au *et al.*, 1993) atua como fibrinogenase A e ativa a proteína C. A Bilineobina (Nikai *et al.*, 1995) cliva ambos os fibrinopeptídeos, A e B. Outro exemplo é a Contortrixobina (Amiconi *et al.*, 2000), que cliva o fibrinopeptídeo B e ativa os fatores V e XIII.

Na Figura 17, estão indicadas algumas enzimas ofídicas que interferem na cascata de coagulação de mamíferos. A Trombocetina (Niewiarowski *et al.*, 1979), a PABj (Serrano *et al.*, 1995) e a Cerastocetina (Marrakchi *et al.*, 1997) promovem agregação plaquetária; a Crotalase (Henschen-Edman *et al.*, 1999), assim como a Batroxobina e a Ancrod, é uma fibrinogenase. Já a TSV-PA (Zhang *et al.*, 1995) ativa o plasminogênio.

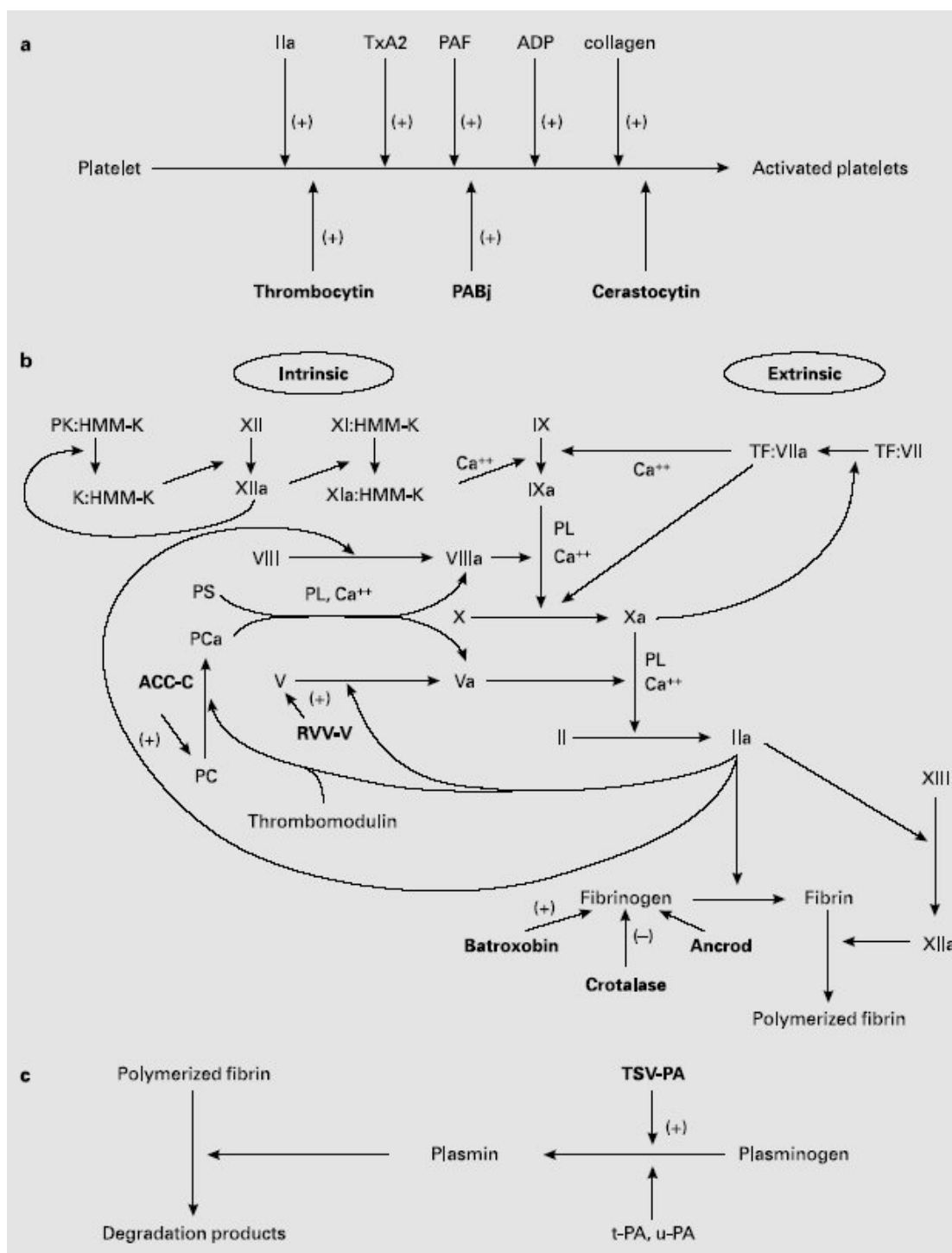


FIGURA 17 – Ação de várias serinopeptidases de peçonhas ofídicas nas três vias da hemostasia: (a) agregação plaquetária, (b) coagulação e (c) fibrinólise. As enzimas ofídicas aparecem em negrito. Retirada de Wisner *et al.*, 2001.

Serinopeptidases de peçonhas ofídicas com atividade desfibrinogenante diminuem o estoque fibrinogênio do sangue, podendo ser aplicadas no tratamento de trombozes e na prevenção de desordens vasculares pela redução da viscosidade sangüínea (Marsh, 2001).

Além de interagirem com os fatores de coagulação sangüínea, o que as torna importantes ferramentas para a investigação dos mecanismos de coagulação, essas enzimas são resistentes a inibidores fisiológicos, interferindo em vários processos hemostáticos que normalmente seriam regulados por tais inibidores. Elas também têm sido bastante utilizadas no desenvolvimento de testes diagnósticos, e constituem modelos moleculares interessantes para a criação de novos agentes terapêuticos e medicamentos. Por terem estruturas semelhantes, desempenhando atividades fisiológicas bem diferenciadas, também são valiosas nos estudos da relação estrutura-função (Braud *et al.*, 2000).

Entretanto, a disponibilidade limitada das peçonhas ofídicas e o alto custo de purificação de suas enzimas, além das reações imunológicas verificadas em muitos pacientes, têm limitado seu uso terapêutico (Warkentin, 1998).

MECANISMO DE AÇÃO DAS SERINOPEPTIDASES DA FAMÍLIA DA QUIMIOTRIPSINA

O mecanismo químico de ação das serinopeptidases consiste no ataque nucleofílico empreendido pela hidroxila de um resíduo ativado de serina sobre o grupo carbonil de ligações peptídicas. Concomitantemente, a His57 captura o próton hidroxílico, interagindo com o Asp102, o que resulta num estado de transição tetraédrico prontamente estabilizado pelos grupos amino da Ser195 e da Gly193 (Figura 18). Finalmente, um próton é transferido da His57 ao fragmento polipeptídico C-terminal da ligação rompida, e a enzima é regenerada por um mecanismo similar onde uma molécula de água atua como nucleófilo (Silva Jr & De Simone, 2004).

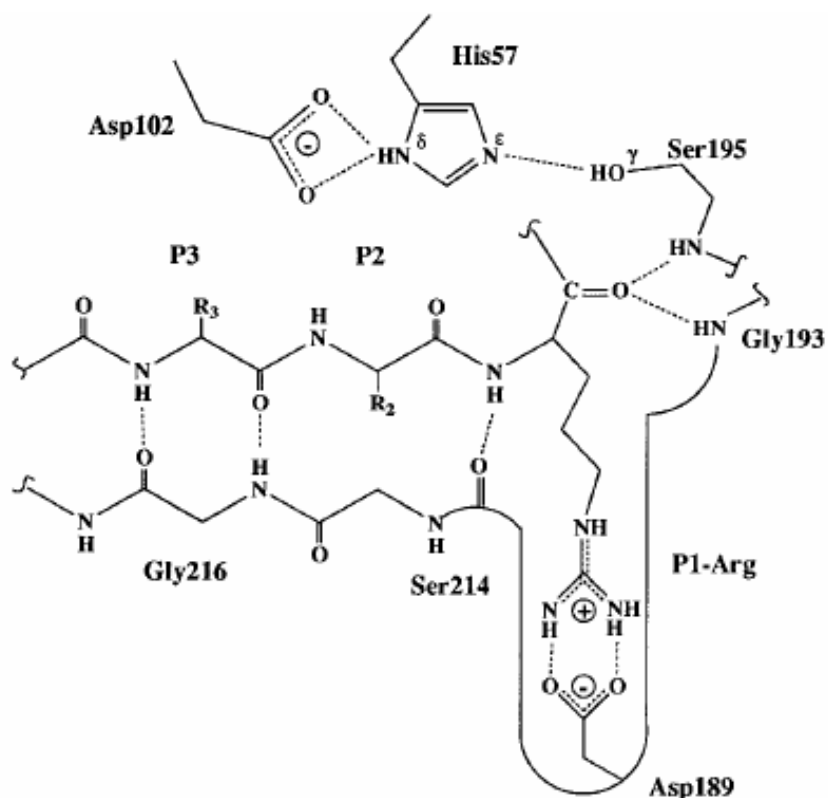


FIGURA 18 – Sítios envolvidos na catálise promovida pelas serinopeptidases. Os grupos catalíticos de enzimas com o enovelamento típico da quimiotripsina interagem com um substrato peptídico ligando-se ao sítio P1 (a nomenclatura definida em 1967 por Schechter & Berguer para os resíduos de aminoácidos do substrato é $P_n, \dots, P_2, P_1, P_1', P_2', \dots, P_n'$, onde P_1-P_1' denota a ligação peptídica hidrolisada. $S_n, \dots, S_2, S_1, S_1', S_2', \dots, S_n'$ denotam os sítios de ligação correspondentes da enzima). São mostradas cinco pontes de hidrogênio nas posições P1 e P3, além de outras pontes de hidrogênio entre os aminoácidos catalíticos. Retirado de Perona & Craick (1997).

Na enzima digestiva tripsina, assim como na maioria das serinopeptidases de peçonhas ofídicas com ação trombina-símile, o resíduo Asp189, negativamente carregado, está posicionado na base do sítio ativo, estabelecendo a necessidade absoluta por resíduos de Arg ou Lys na posição P1 dos substratos (Silva Jr. & De-Simone, 2004). Entretanto, experimentos de mutagênese sítio-dirigida têm mostrado

que os resíduos citados (Ser195, His57, Asp102, Gly193 e Asp189) não são os únicos determinantes da especificidade por um substrato (Perona & Craick, 1995), havendo uma contribuição cooperativa de outros resíduos distais situados na superfície da proteína (Stubbs & Bode, 1995).

BREVE HISTÓRICO DA SISTEMÁTICA BIOLÓGICA

O Dicionário Eletrônico Houaiss (2001) define a Sistemática como a ciência que classifica os seres vivos por meio do estudo comparativo de suas características morfológicas, fisiológicas, genéticas e evolutivas, visando reconstruir seu histórico evolucionário.

Pinna, num artigo publicado no ano 2001, afirmou que a existência de uma hierarquia na distribuição das características dos organismos foi a descoberta mais antiga e fundamental da Sistemática. Os primórdios dessa descoberta precedem em séculos o entendimento dos mecanismos evolutivos associados.

Há cerca de 450 anos, o naturalista suíço Conrad Gesner (1516-1565) fez uma compilação de todas as informações até então conhecidas sobre os animais, publicando-as com o título de “*Historia animalium*”, numa clara referência à obra do pensador grego Aristóteles (384-322 a.C.). Ele nomeou as espécies em latim, provavelmente inspirando a nomenclatura binominal proposta anos depois por outro naturalista suíço, Carolus Linnaeus (1707-1778).

Gesner dispôs as espécies em ordem alfabética, sendo que animais evidentemente relacionados eram citados em sequência na lista, o que demonstra um incipiente entendimento da noção de parentesco. Numa obra botânica posterior, publicada em dois volumes com o nome de “*Conradi Gesneri Opera Botanica*”, ele propôs um sistema que organizava as plantas em ordens, famílias e espécies, antecedendo em dois séculos o sistema similar e muito mais conhecido de Linnaeus. Infelizmente a publicação dos dois volumes foi tardia, em 1751 e 1771, e eles não tiveram o impacto que mereciam, obscurecidos pela ampla divulgação do sistema de classificação universal de Linnaeus, oficialmente baseado na lógica aristotélica.

Na segunda metade do século XIX, ainda predominava a visão aristotélica intuitiva, que buscava a semelhança geral entre os organismos, não levando muito em conta as relações evolutivas. Foram as teorias da evolução orgânica, sobretudo os trabalhos do naturalista inglês Charles Darwin (1809-1882) e do galês Alfred R. Wallace (1823-1913), que provocaram alterações profundas na Sistemática, assim como em outras ciências.

A taxonomia passou a ser vista como uma das principais evidências da evolução, uma vez que, segundo Darwin, a hierarquia dos seres vivos só poderia ter sido tão bem definida se resultasse de um processo histórico de descendência com modificações. Esta nova visão foi consolidada com os trabalhos do zoólogo alemão Ernst Haeckel (1834-1919) na transição entre os séculos XIX e XX. Ele estabeleceu as bases do pensamento evolutivo na morfologia, criando o termo filogenia para denotar a história evolucionária dos grupos de seres vivos e popularizando ainda mais as idéias de Darwin.

Nos anos 40, numa tentativa de moldar as técnicas e bases vigentes da classificação dos organismos às recentes e numerosas descobertas da genética, o Neodarwinismo associou a teoria evolutiva de Darwin com a Genética mendeliana. Entretanto, as características básicas da Sistemática não foram alteradas. A síntese neodarwinista estava em declínio quando, em 1960, ocorreu uma revolução no sistema de classificação vigente.

A sistemática filogenética, também chamada de cladismo (do grego *klados*, ramo) surgiu quando o entomólogo alemão Willi Hennig (1913-1976) apresentou suas idéias sobre o relacionamento filogenético de táxons (unidades taxonômicas, por exemplo espécies, gêneros ou famílias) baseado na evolução de caracteres. Hennig notou que, ao longo da evolução dos organismos, os caracteres evoluíam de um estado primitivo para outro derivado. Para ele, apenas relações de ancestralidade comum (do tipo A e B compartilham um ancestral comum exclusivo) podiam gerar hipóteses testáveis. As idéias sobre relações de parentesco evolutivo deviam ser expressas como uma hierarquia de ancestrais comuns hipotéticos (relações de grupos irmãos). Relações ancestral-descendente (do tipo A deu origem a B) não deveriam ser aceitas, pois dificilmente poderiam ser cientificamente testadas. Desta

maneira, organismos reais nunca são considerados ancestrais de outros organismos reais, e sim elementos unidos por hipóteses de ancestralidade comum. Os diagramas filogenéticos (ou cladogramas) modernos mostram organismos reais apenas em suas extremidades.

O cladismo foi revolucionário porque, a partir do estabelecimento de suas bases, descobriu-se que muitos grupos taxonômicos tradicionalmente aceitos, como répteis ou peixes, na realidade não são válidos, pois não compartilham um ancestral comum exclusivo. Naturalmente, tais descobertas levaram a numerosos rearranjos na classificação de vários grupos de seres vivos.

A primeira tentativa de representar filogenias foi feita por Lamarck, em 1809. Seu diagrama é o único desenho presente no livro “A Origem das Espécies”, de Darwin, lançado em 1859. No ano de 1866, Haeckel desenhou uma árvore bastante questionável do ponto de vista científico, onde tentava relacionar todos os grupos de seres vivos, incluindo microorganismos, plantas e animais. Reijmers *et al.*, em 1999, afirmaram que a melhor forma de representar filogenias é por meio de árvores que definam certos relacionamentos ancestrais entre espécies ou mesmo entre moléculas. Conforme mostrado na Figura 19, o nó da base da árvore, denominado raiz, representa o ancestral comum a todos os elementos relacionados.

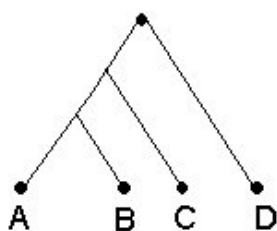


FIGURA 19 – Esquema de uma árvore filogenética hipotética evidenciando quatro táxons evolutivamente relacionados. O ponto superior representa o ancestral comum a todos os táxons.

A análise filogenética é hoje um campo altamente técnico, dotado de um extenso e sofisticado arsenal. Sua área de atuação é a formulação de hipóteses

sobre parentesco filogenético. Estas hipóteses são propostas de forma objetiva e testadas com o auxílio de programas de computador.

Entende-se atualmente que a história filogenética dos seres vivos pode ser reconstruída com base nos mais variados sistemas orgânicos, das seqüências de DNA e de proteínas à morfologia e aos padrões de comportamento. Não é possível saber *a priori* onde a história evolutiva deixou seus traços, portanto todas as potenciais pistas devem ser investigadas.

BIOINFORMÁTICA

A Bioinformática, ciência que mescla diferentes áreas do conhecimento, como a Engenharia de Softwares, a Matemática e a Estatística, a Ciência da Computação e a Biologia Molecular, nasceu nos anos 70, em resposta às necessidades criadas pelo acúmulo cada vez maior de informações biológicas.

Em 1956, a seqüência dos resíduos de aminoácidos que constituem a insulina bovina foi determinada. Cerca de 10 anos depois, era seqüenciado o RNA transportador da alanina em leveduras. Em 1972, foi criado o banco de dados de estruturas conhecido como PDB (Protein Database Bank). Posteriormente, surgiram programas como o MULTALIN (criado por Corpet em 1988, e disponível no site http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalin.html), o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, desenvolvido por Altschul *et al.* em 1990 e aperfeiçoado pelo mesmo grupo em 1997, disponível no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), e o CLUSTAL W (criado por Thompson *et al.* em 1994 e disponível em <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>), utilizados para comparar seqüências novas com outras pré-existentes nos bancos de dados.

Simultaneamente ao desenvolvimento da Bioinformática, a Biologia Molecular avançou consideravelmente com a criação das técnicas de PCR, a tecnologia do DNA recombinante, o aperfeiçoamento da expressão protéica em sistemas heterólogos, e a melhoria dos procedimentos cromatográficos e de renaturação protéica.

O surgimento dos seqüenciadores automáticos de DNA e de peptídeos na década de 90 fez com que o número de genes e proteínas seqüenciados aumentasse enormemente, exigindo a ampliação das condições de armazenamento e análise até então existentes. Este advento representou um importante incentivo para a Bioinformática. Hoje estão disponíveis diversos programas capazes de realizar a interpretação das informações biológicas. Muitos deles são gratuitos, desenvolvidos por universidades que defendem e estimulam o fluxo livre de técnicas científicas, e cabe ao bioinformata testá-los para descobrir aqueles que melhor trabalham os seus dados, atingindo resultados mais confiáveis.

MODELAGEM MOLECULAR BASEADA EM HOMOLOGIA

Uma das aplicações mais conhecidas da Bioinformática é a modelagem molecular (ou modelagem comparativa) baseada em homologia.

Prosdociami *et al.* (2003) afirmaram que atualmente existem técnicas eficazes para determinar a estrutura terciária de proteínas, como NMR (Ressonância Magnética Nuclear) e cristalografia por difração de raios-X. Muitas proteínas tiveram sua estrutura resolvida por esses métodos, passando a constituir modelos efetivos para o desenvolvimento de programas de modelagem e também para a modelagem por homologia. O grande problema é que os métodos experimentais normalmente são caros e de difícil execução. Não é fácil obter grandes quantidades da proteína de interesse em sua forma pura, e se esta for uma proteína de membrana ou apresentar glicosilações, a obtenção dos cristais torna-se quase impossível.

Considerando-se que, ao longo da evolução, as estruturas tridimensionais de proteínas homólogas têm sido muito mais preservadas do que suas seqüências primárias, a modelagem comparativa é um método eficiente para predizer a estrutura tridimensional quando a identidade das seqüências comparadas é elevada, gerando um modelo com qualidade comparável a uma estrutura produzida por cristalografia de raios-X com baixa resolução (Martí-Renom *et al.*, 2000).

Como apresentado na Figura 20, a modelagem de proteínas começa com a identificação de proteínas homólogas (derivadas do mesmo ancestral) à proteína de interesse, num banco de dados de proteínas com estrutura resolvida. Conhecidas as maiores homologias, é realizado um alinhamento múltiplo das seqüências, uma vez que as informações seqüenciais são transpostas para a composição estrutural.

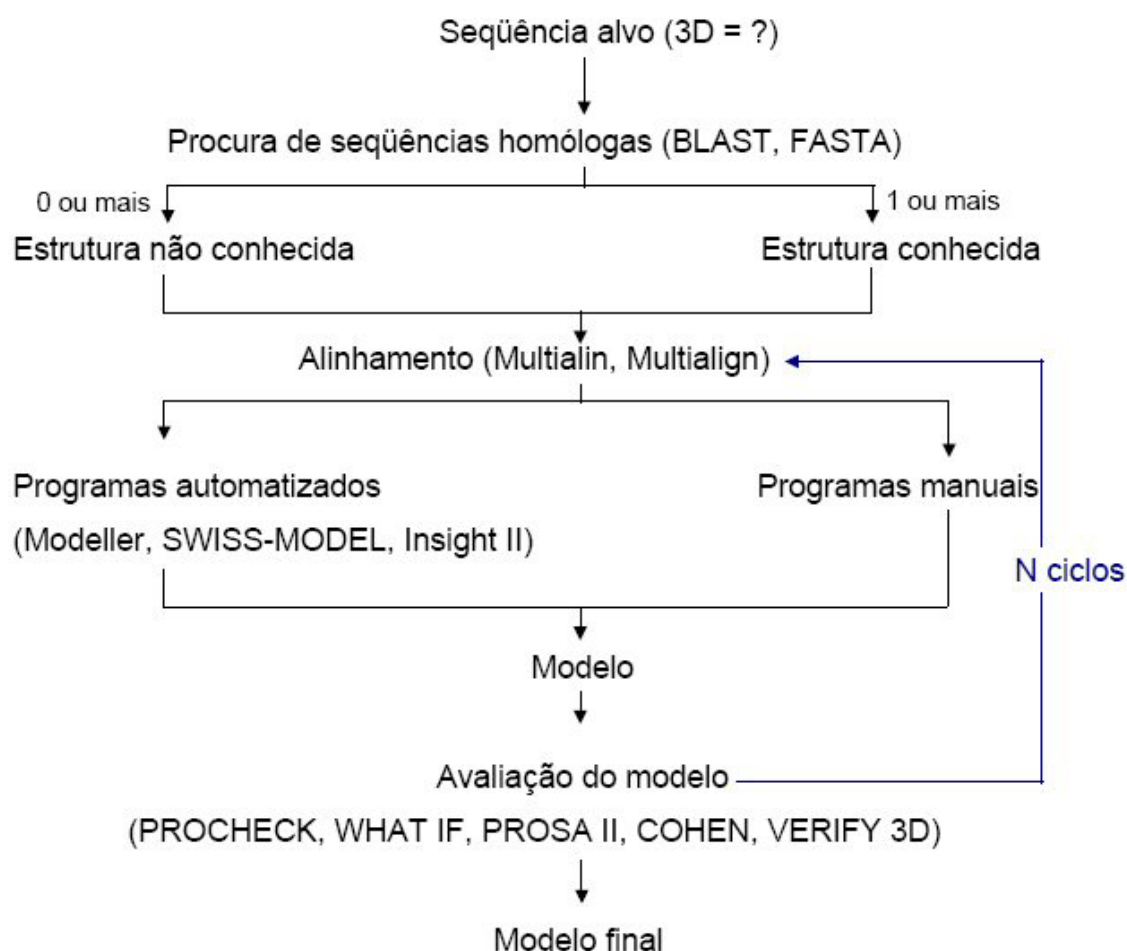


FIGURA 20 – Modelagem molecular de proteínas por homologia, baseada no fato de que proteínas homólogas tendem a assumir conformações semelhantes. Esquema retirado de Ramos (2001).

Existem dois tipos de bancos de dados para pesquisa de genes e proteínas:

Os bancos de dados primários apresentam resultados de dados experimentais publicados com alguma interpretação, sem um detalhamento mais apurado em relação a outros já publicados. Este é o caso do GenBank (criado em 1988 e disponível no site do National Center for Biotechnology Information, ou NCBI, dos Estados Unidos: www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e do PDB (Westbrook *et al.*, 2002).

Os bancos de dados secundários são aqueles cujos dados de entrada são compilados e interpretados, fornecendo informações mais representativas. SWISS-PROT e TrEMBL (Bairoch & Apweiler, 2000) pertencem a este grupo.

A modelagem propriamente dita é realizada por meio de programas como o MODELLER (Sali & Blundell, 1993), que buscam uma estrutura terciária que melhor se aproxime da disposição dos átomos das proteínas utilizadas como modelo, atendendo simultaneamente às restrições estereoquímicas.

Após a obtenção do primeiro modelo, este deve passar por diversas avaliações de qualidade, seguidas por modificações manuais, até que se chegue a um modelo satisfatório. Earps & Shoolingin-Jordan afirmaram em 1998 que a intuição do bioinformata torna-se essencial para corrigir manualmente o posicionamento de resíduos de aminoácidos da proteína de interesse em regiões de inserções ou deleções em relação ao modelo. Isso acontece porque, por mais que a modelagem automatizada esteja evoluindo, o conhecimento incompleto sobre o enovelamento e a dinâmica protéicos torna necessária a aplicação da máxima cautela e do senso crítico do cientista.

Quando se atinge uma estrutura considerada satisfatória, ela é finalmente submetida à minuciosa avaliação de programas que verificam as restrições estereoquímicas, como o PROCHECK (Laskowski, 1993).

A modelagem de proteínas é uma técnica heurística. Mesmo que a estrutura obtida concorde perfeitamente com as restrições impostas, não há garantias de que esteja totalmente correta. Entretanto, uma estrutura semelhante à real pode ser suficiente para a formulação de novas hipóteses, atendendo assim às expectativas do pesquisador (Prosdocimi *et al.*, 2003).

FILOGENIA MOLECULAR

Desde o início do século XX, quando estudos imunoquímicos demonstraram que reações sorológicas cruzadas eram mais intensas em organismos aparentados, a Filogenia Molecular passou a receber grande atenção dos pesquisadores.

No começo, apenas informações morfológicas, paleontológicas e fisiológicas eram consideradas nos estudos filogenéticos. Essa Sistemática Fenética, baseada em dados observados a partir do fenótipo dos organismos, passou a ser considerada extremamente subjetiva, pois não havia um método bem definido para selecionar e analisar as características comparadas.

A partir dos anos 50, técnicas de Biologia Molecular como eletroforese protéica, hibridização de DNA e outros métodos imunológicos passaram a ser empregados no estabelecimento de filogenias e se difundiram rapidamente. Entretanto, eles apresentavam alto custo e nem sempre atingiam a eficiência desejada.

Na década de 70, com o avanço do cladismo, a idéia de que caracteres homólogos forneciam informações preciosas a respeito da história evolutiva ganhou força, e os dados obtidos pelo seqüenciamento de DNA e de proteínas começaram a ser utilizados na montagem de árvores filogenéticas, complementando os estudos taxonômicos clássicos.

Cada espécie existente hoje apresenta um conjunto de características ancestrais (plesiomorfias), que pouco ou nada se alteraram desde os ancestrais mais antigos e que não têm valor na inferência filogenética, assim como as homoplasias (convergências, reversões ou paralelismos). Neste tipo de estudo, o que importa são as variações das características derivadas (sinapomorfias), que servem de base para a composição das árvores filogenéticas.

A princípio, a definição da característica ancestral foi alvo de muitas críticas (Lee, 1999), até que foram estabelecidos alguns critérios cujas interpretações e aplicações fossem independentes da filogenia, como a comparação paleontológica, a ontogenia (desenvolvimento desde a concepção até a idade adulta) das características em estudo e especialmente a observação de grupos externos.

Características usadas em inferências filogenéticas obrigatoriamente devem ter base genética, sendo herdadas e refletindo as relações de parentesco entre os organismos.

Os dados moleculares representam um universo bem mais amplo de características à disposição do investigador do que os dados morfológicos, pois cada nucleotídeo ou aminoácido é considerado um caráter independente na análise (Li & Graur, 1991).

Inicialmente, é necessário alinhar as seqüências a serem estudadas por meio de uma função objetiva de alinhamento que permita a replicação dos dados e seja lógica. Algoritmos de alinhamento múltiplo trabalham analisando o custo e o benefício de assumir substituições, inserções ou deleções, assinalando um valor para esses eventos e tentando achar o alinhamento de menor valor. Para que os dados não percam sua informação filogenética, o custo de inserções e deleções sempre deve ser maior que o de substituições. Programas de computador alinham seqüências passo a passo, considerando primeiramente um par de táxons e adicionando os demais subsequente.

As três metodologias que analisam dados moleculares para a inferência filogenética se baseiam em avaliações de distância, máxima parcimônia e máxima verossimilhança (Felsenstein, 1988).

Nessas abordagens, a definição de quais substituições em um alinhamento são sinapomorfias é feita pela comparação das mesmas com um grupo externo. Ainda assim permanece alguma incerteza quanto aos resultados, uma vez que a probabilidade de uma homoplasia estar sendo observada depende muito da natureza da molécula, e a maioria dos métodos de análise filogenética existentes não considera fatores probabilísticos.

Cada metodologia pode aplicar algoritmos, que cumprem uma seqüência de passos para construir a árvore filogenética e chegar a uma resposta única. Alternativamente, podem ser usados critérios de otimização, que analisam árvores filogenéticas arbitrárias para encontrar aquela que minimize ou maximize uma certa grandeza, como o número de substituições. Estes critérios são mais complexos do

que os algoritmos, já que devem analisar o maior número possível de árvores, e às vezes este número é tão grande que impossibilita a análise.

Felizmente, nos dias de hoje existem metodologias satisfatórias que permitem encontrar a melhor árvore sem examinar necessariamente todas as possibilidades (Felsenstein, 1989).

MÉTODOS BASEADOS NA PARCIMÔNIA

De acordo com Felsenstein (1988), a origem do termo parcimônia remonta ao século XIII, quando William de Ockham lançou o princípio da navalha de Ockham: “Hipóteses mais simples devem prevalecer sobre as mais complexas quando as duas explicarem determinada questão com igual eficiência”.

Os métodos baseados em parcimônia são os mais utilizados para inferir filogenias. Eles assumem como premissa que as características analisadas evoluem lentamente, e procuram a árvore que minimize o número de passos necessários para explicar os padrões observados nos dados moleculares.

Cada um desses métodos permite certos tipos de substituição, atribuindo-lhes pesos específicos, o que resulta em abordagens distintas, como as parcimônias de Fitch (todas as mudanças são iguais), Dollo (apomorfias ou caracteres derivados devem surgir uma única vez), Wagner (as mudanças têm polaridade), Camin-Sokal (evolução irreversível) e de transversão (peso maior para mudanças que envolvem transversões, ou seja, substituições de purinas por pirimidinas ou vice-versa). Em geral, todas elas podem ser resumidas na parcimônia generalizada, onde se utiliza uma matriz auxiliar que estipula o peso de cada mudança, baseada em evidências independentes da sua frequência.

Métodos de parcimônia são criticados por defenderem que a evolução é lenta ou, pelo menos, ocorre com a mesma velocidade em todas as linhagens. Yang (1996) relatou que isto não é verdade para muitos tipos de moléculas, mostrando a inconsistência do método (Felsenstein, 1978). Desta forma, quanto mais dados forem

analisados, maior será a certeza de que a árvore incorreta obtida é, na verdade, a certa. Na Figura 21 observa-se um exemplo dessa inconsistência.

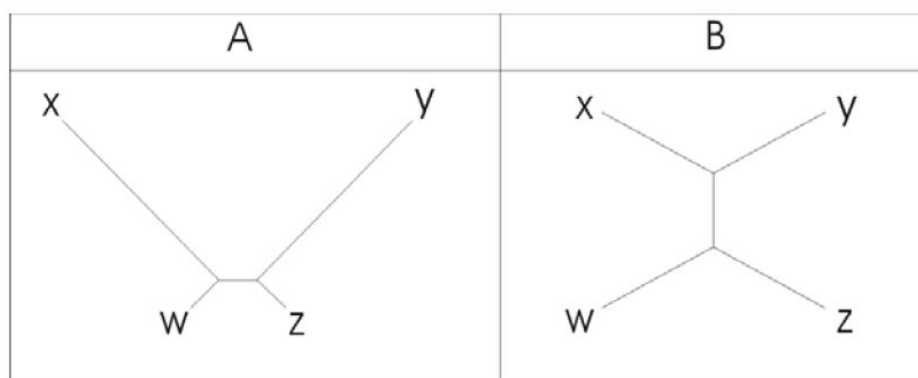


FIGURA 21 – Exemplo de inconsistência da parcimônia em casos de ocorrência de táxons de evolução muito variada entre organismos, cenário possível em eventos de irradiação adaptativa onde há a exploração de novos nichos e atuam grandes pressões seletivas. A árvore **A**, com ramos proporcionais ao número de substituições ocorridas, é a correta. A árvore **B** foi inferida por parcimônia. Devido ao grande número de substituições atuando nos longos ramos que levam aos organismos x e y, é maior a chance de se formarem muitas homoplasias entre as seqüências destes táxons, tornando-as artificialmente semelhantes. Retirado de Alves (2001).

MÉTODOS BASEADOS NA DISTÂNCIA ENTRE AS SEQÜÊNCIAS

Considerados os mais dinâmicos entre todos os métodos de inferência filogenética, são especialmente úteis em análises que avaliam muitos caracteres.

Consistem em dois passos independentes: computação das distâncias entre as seqüências e construção (por métodos algorítmicos) ou avaliação (por métodos de otimização) de uma árvore. O método algorítmico produz uma única árvore, enquanto o método de otimização pode gerar diferentes árvores que se adequem à matriz de distâncias.

As distâncias são processadas duas a duas, resultando numa matriz triangular com $N(N-1)/2$ valores, onde N é o número de táxons no alinhamento. Há fórmulas distintas para o cálculo da distância entre suas seqüências, baseadas em diferentes modelos evolutivos. Por isso, é importante selecionar o modelo correto.

Tais fórmulas contêm correções matemáticas para compensar divergências muito amplas entre as seqüências, evitando a subestimação da verdadeira distância evolutiva conforme mostrado na Figura 23.

Os métodos baseados em critérios de otimização para construir árvores a partir de matrizes de distância selecionam a árvore que minimize a soma dos quadrados das diferenças entre as distâncias observadas. Os métodos algorítmicos executam uma série de passos que adicionam os táxons gradualmente, calculando o comprimento dos ramos da árvore resultante, até atingir o menor valor numérico possível. Entre os mais utilizados estão o UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) e o “neighbor joining” (Saitou & Nei, 1987). O primeiro admite que todas as linhagens evoluíram na mesma velocidade, como se obedecessem a um relógio molecular. A árvore ultramétrica produzida por este método mostra a mesma distância entre a raiz e qualquer um dos táxons (Figura 22). O segundo método permite que cada linhagem apresente uma taxa evolutiva diferente das outras, resultando numa árvore aditiva e não-ultramétrica, cujas distâncias entre a raiz (se houver) e os táxons terminais pode variar (Figura 22).

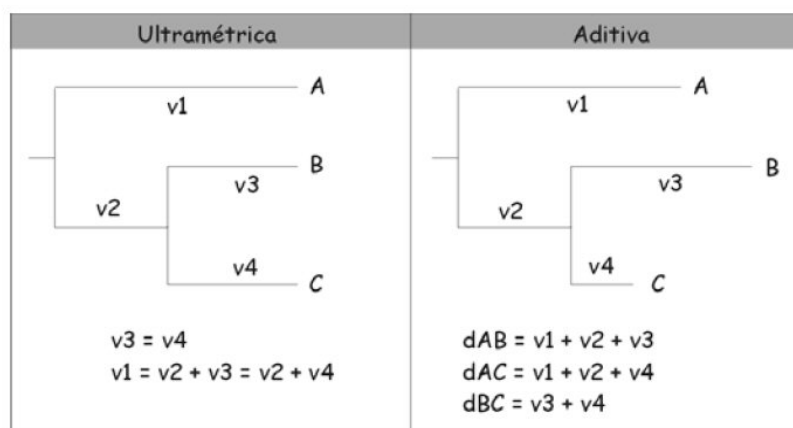


FIGURA 22 – Exemplos de árvores ultramétrica e aditiva. Fonte: Li & Graur (1991).

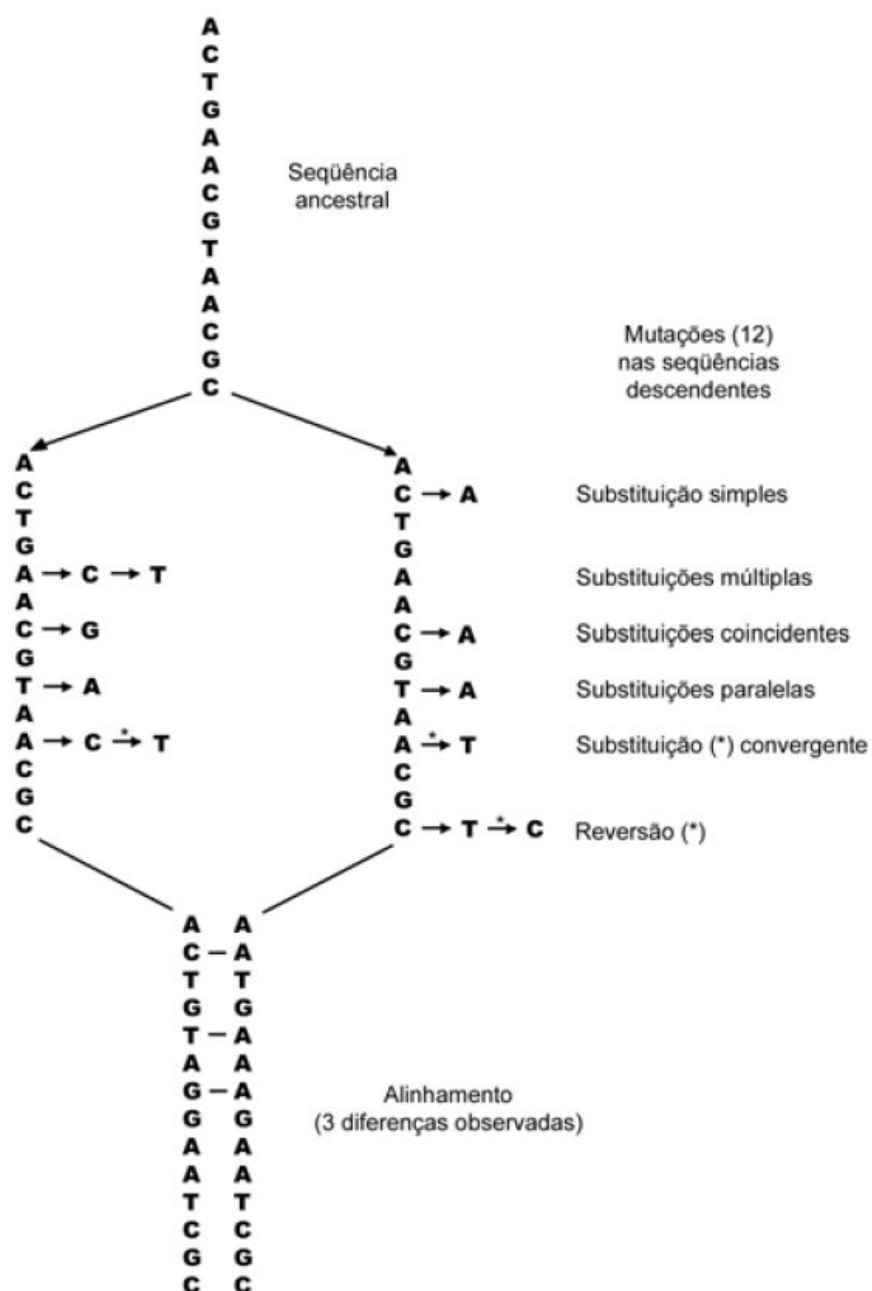


FIGURA 23 – Evolução simulada de duas seqüências a partir de um ancestral comum, evidenciando as mutações e nomeando os tipos de substituição envolvidos. Representação retirada de Li & Graur (1991).

A maior crítica aos métodos de distância é que, ao se calcular a distância entre duas seqüências, ocorreria uma grande perda de informação. Por exemplo, ao serem observadas três seqüências alinhadas A, B e C, sendo $D_{AB}=0,3$, $D_{AC}=0,3$ e $D_{BC}=0,1$, não é correto concluir que B é igual a C simplesmente pelo fato de serem eqüidistantes de A, pois a natureza das diferenças entre A, B e C foi perdida no cálculo das distâncias. Este tipo de inferência é considerado pelos cladistas tão errôneo quanto os métodos fenéticos puros, que consideram as características analisadas igualmente válidas para a definição do parentesco.

Devem ser destacados ainda os métodos de máxima verossimilhança, que realizam uma grande quantidade de cálculos estatísticos, requerendo modelos de evolução molecular totalmente explícitos (Farris, 1999). Sua implementação é bastante complexa, exigindo na prática a utilização de computadores velozes (Swofford *et al.*, 1996). Somente nos últimos anos esta metodologia conseguiu mais adeptos, ainda que análises com uma quantidade maior de táxons possam demorar semanas.

OBJETIVOS

Os temas desenvolvidos nesta introdução geral, que de fato consistiu numa revisão bibliográfica, demonstram que serinopeptidases de peçonhas de serpentes com ação no sistema hemostático de mamíferos representam alternativas terapêuticas para enfermidades que assolam atualmente a humanidade. Tendo em vista as potenciais aplicações biotecnológicas e clínicas das referidas enzimas, este trabalho teve como objetivos:

- ▶ Clonar, expressar e purificar parcialmente a BthaTL, uma serinopeptidase recombinante de *Bothrops alternatus*, realizando ensaios preliminares de caracterização enzimática;
- ▶ Estimar a estrutura tridimensional da BthaTL aplicando técnicas de modelagem molecular baseada em homologia;
- ▶ Correlacionar evolutivamente algumas serinopeptidases de peçonhas ofídicas com ação trombina-símile e as serinopeptidases “clássicas” com a BthaTL por meio de duas técnicas distintas de reconstrução filogenética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. (1990) Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, **215**, 403-410.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, **25**, 3389-3402.
- ALVES, J. P. M. Caracterização e filogenia moleculares de *Acanthamoeba*. (2001) **Tese para obtenção do título de doutor em ciências (Universidade de São Paulo), 210p.**
- AMICONI, G., AMORESANO, A., BOUMIS, G., BRANCACCIO, A., DE CRISTOFARO, R., DE PASCALIS, A., DI GIROLAMO, S., MARAS, B. & SCALONI, A. (2000) A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. **Biochemistry**, **39** (33), 10294-10308.
- ANONICK, P. K., WOLF, B. & GONIAS, S. L. (1990) Regulation of plasmin, miniplasmin, and streptokinase-plasmin complex by alpha 2-antiplasmin, alpha 2-macroglobulin, and antithrombin III in the presence of heparin. **Thromb. Res.**, **59**, 449-462.
- ARIËNS, R. A. S., LAI, T. S., WEISEL, J. W., GREENBERG, C. S. & GRANT, P. J. (2002) Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects on genetic polymorphisms. **Blood**, **100** (3), 743-754.

- AU, L. C., LIN, S. B., CHOU, J. S., THE, G. W., CHANG, K. J. & SHIH, C. M. (1993) Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for Ancrod, a thrombin-like enzyme from the venom of *Calloselasma rhodostoma*. **Biochem. J.**, **294** (2), 387-390.
- BAIROCH, A. & APWEILER, R. (2000) The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. **Nucleic Acids Res.**, **28** (1), 45-48.
- BARRAVIEIRA, B. (1991) Acidentes por serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. **Arq. Bras. Med.**, **65** (4), 345-355.
- BAUER, K. A. & ROSEMBERG, R. D. (1991) Role of antithrombin III as a regulator of in vivo coagulation. **Semin. Hematol.**, **28**, 10-18.
- BODE, W., TURK, D. & KARSHIKOV, A. (1992) The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human [α]-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. **Protein Sci.**, **1**, 426-471.
- Brasil. Ministério da Saúde. (2001) **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Fundação Nacional de Saúde.
- BRAUD, S., BON, C. & WISNER, A. (2000) Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, **82**, 851-859.
- CAMERER, E., KOLSTO, A. B. & PRYDZ, H. (1996) Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. **Thromb. Res.**, **81**, 1-41.

- CASTRO, H. C., SILVA, D. M., CRAICK, C. & ZINGALI, R. B. (2001) Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin. **Thromb. Haemost.**, **81**, 81-86.
- CASTRO, H. C., ZINGALI, R. B., ALBUQUERQUE, M. G., PUJOL-LUZ, M. & RODRIGUES, C. R. (2004) Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cell. Mol. Life Sci.**, **61**, 843-856.
- CAVINATO, R. A., REMOLD, H & KIPNIS, T. L. (1998) Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. **Toxicon**, **36**, 257-267.
- CHIPPAUX, J. P., WILLIAMS, V. & WHITE, J. (1991) Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, **29** (11), 1279-1303.
- COATES, M. & RUTA, M. (2000) Nice snakes, shame about the legs. **Trends Ecol. Evol.**, **15**, 503-507.
- COLMAN, R. W. & SCHMAIER, A. H. (1997) Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive and proinflammatory attributes. **Blood**, **90**, 3819-1843.
- CORPET, F. (1998) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res.**, **16**, 10881-10890.
- CUNDALL, D. & GREENE, H. W. (2000) Feeding in snakes. In: **Feeding, form, function and evolution in tetrapod vertebrates**. Ed. K. Schwenk, San Diego, CA, 293-333.

- DALTRY, J. C., WÜSTER, W. & THORPE, R. S. (1996) Diet and snake venom evolution. **Nature**, **379**, 537-540.
- EARPS, L. & SHOOLINGIN-JORDAN, P. M. (1998) Molecular modelling of Batroxobin on Kallikrein. **Biochem. Soc. Trans.**, **26**, 283.
- FANTL, P. (1961) A comparative study of blood coagulation in vertebrates. **Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, **39**, 403-412.
- FARRIS, J. S. (1999) Likelihood and Inconsistency. **Cladistics**, **15**, 199-204.
- FELSENSTEIN, J. (1978) Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. **Syst. Zool.**, **27**, 401-410.
- FELSENSTEIN, J. (1988) Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. **Annu. Rev. Gen.**, **22**, 521-565.
- FELSENSTEIN, J. (1989) **Phylip 3.2 Manual**, University of California, Herbarium, Berkeley, CA.
- FORSTNER, M. R. J., DAVIS, S. K. & ARÉVALO, E. (1995) Support for the hypothesis of anguimorph ancestry for the suborder Serpentes from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA sequences. **Mol. Phyl. Evol.**, **4**, 93-102.
- FRANCISCHETTI, I. M. B., CASTRO, H. C., ZINGALI, R. B., CARLINI, C. R. & GUIMARÃES, J. A. (1998) *Bothrops* sp. Snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp. Biochem. Physiol.**, **119C** (1), 21-29.

- FREY VOGEL, T. A. & PERRET, B. A. (1973) Notes on toxicology. **Experientia**, **29** (11), 1137-1452.
- GREER, A. E. (1991) Limb reduction in squamates: identification of the lineages and discussion of the trends. **J. Herpetol.**, **25**, 166-173.
- GUTIÉRREZ, J. M., CHAVES, F. & BOLANOS, R. (1980) Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. **Rev. Biol. Trop.**, **28**, 341-351.
- HENSCHEN-EDMAN, A. H., THEODOR, I., EDWARDS, B. F. & PIRKLE, H. (1999) Crotalase, a fibrinogen-clotting snake venom enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin. **Thromb. Haemost.**, **81**, 81-86.
- HOUAISS, A. (2001) Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa, versão 1.0. Ed. Objetiva. Rio de Janeiro.
- HUNG, C. C., HUANG, K. F. & CHIOU, S. H. (1994) Characterization of one novel venom protease with beta-fibrinogenase activity from the Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*): purification and cDNA sequence analysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **205** (3), 1707-1715.
- HUTTON, R. A. & WARRELL, D. A. (1993) Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Reviews**, **7**, 176-189.
- ITOH, N., TANAKA, N., MIHASHI, S. & YAMASHINA, I. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for Batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.**, **262** (7), 3132-3135.

- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. & HO, P. L. (2002) 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). **Gene**, **299**, 279-291.
- KAWABATA, S., KIHARA, H., OHNO, M. & IWANAGA, S. (1988) Amino acid sequence of a coagulant enzyme, flavoxobin, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J. Biochem.**, **103** (4), 596-605.
- KEARNEY, M. (2003) Systematics of the Amphisbaenia (Lepidosauria: Squamata) based on morphological evidence from recent and fossil forms. **Herpetol. Mongr.**, **17**, 1-74.
- LASKOWSKI, R. A. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.** **26**, 283-291.
- LEE, M. S. Y. (1997) The phylogeny of varanoid lizards and the affinities of snakes. **Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B**, **352**, 53-91.
- LEE, M. S. Y. (1999) Circularity, evolution, systematics... and circularity. **J. Evol. Biol.**, **12**(4), 724-734
- LEE, M. S. Y. & CALDWELL, M. W. (1998) Anatomy and relationships of *Pachyrhachis problematicus*, a primitive snake with hindlimbs. **Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B**, **352**, 1521-1552.
- LEE, M. S. Y. & CALDWELL, M. W. (2000) *Adriosaurus* and the affinities of mosasaurs, dolichosaurs and snakes. **J. Palaentol.**, **74**, 915-937.
- LEE, M. S. Y. & SCANLON, J. D. (2002) Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. **Biol. Rev.**, **77**, 333-401.

- LESK, A. M. & FORDHAM, W. D. (1996) Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **J. Mol. Biol.**, **258**, 501-537.
- LI, W. H. & GRAUR, D. (1991) **Fundamentals of molecular evolution**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- MAGALHAES, A., FERREIRA, R. N., RICHARDSON, M., GONTIJO, S., YARLEQUE, A., MAGALHAES, H. P. B., BLOCH, C. & SANCHEZ, E. F. (2003) Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. **Comp. Biochem. Phys.**, **136**, 255-266.
- MAGRIN, R. A., VITORINO-CARDOSO, A. F., BRITES, V. L. C., HAMAGUCHI, A. & HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (2002) Variabilidade intraespecífica em peçonhas de serpentes irmãs da espécie *Bothrops moojeni* (Viperidae, Crotalinae). **Revista Eletrônica Horizonte Científico**. www.propp.ufu.br, **1**, 1-12.
- MARKLAND, F. S. (1998a) Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, **36**, 1749-1800.
- MARKLAND, F. S. (1998b) Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. **Thromb. Haemost.**, **79**, 668-674.
- MARRAKCHI, N., BARBOUCHE, R., BON, C. & EL AYEB, M. (1997) Cerastatin, a new potent inhibitor of platelet aggregation from the venom of the Tunisian viper, *Cerastes cerastes*. **Toxicon**, **35**, 125-135.
- MARSH, N. A. (2001) Diagnostic uses of snake venom. **Haemostasis**, **31**, 211-217.

- MARTÍ-RENO, M. A., STUART, A., FISER, A., SÁNCHEZ, R., MELO, F. & SALI, A. (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, **29**, 291-325.
- MATSUI, T., FUJIMURA, Y. & TITANI, K. (2000) Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, **1477**, 146-156.
- MAYER, M. (1990) Biochemical and biological aspects of the plasminogen activation system. **Clin. Biochem.**, **23**, 197-211.
- MELOUN, B., KLUH, I., KOSTKA, V., MORAVEK, L., PRUSIK, Z., VANACEK, J., KEIL, B. & SORM, F. (1966) Covalent Structure of Bovine Chymotrypsinogen A. **Biochem. Biophys. Acta**, **130**, 543.
- MONTEIRO, R. Q., CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A., BOM, C. & ZINGALI, R.B. (1997) Distinct Bothrojaracin isoforms produced by individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snakes. **Toxicon**, **35** (5), 649-657.
- NIEMIAROWSKI, S., KIRBY, E. P., BRUDZYNSKI, T. M. & STOCKER, K. (1979) Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. **Biochemistry**, **18**, 3570-3577.
- NIKAI, T., OHARA, A., KOMORI, Y., FOX, J. W. & SUGIHARA, H. (1995) Primary structure of a coagulant enzyme, Bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, **318** (1), 89-96.
- NISHIDA, S., FUJIMURA, Y., MIURA, S., OZAKI, Y., USAMI, Y., SUZUKI, M., TITANI, K., YOSHIDA, E., SUGIMOTO, M., YOSHIOKA, A. & FUKUI, H. (1994) Purification and characterization of Bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, **33** (7), 1843-1849.

- PE, T., LWIN, N. N., MYINT, A. A., HTWE, K. M. & CHO, K. A. (1995) Biochemical and biological properties of the venom from Russel's viper (*Daboia russelli siamensis*) of varying ages. **Toxicon**, **33** (6), 817-821.
- PERONA, J. J. & CRAIK, C. S. (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases (Review). **Protein Sci.**, **4**, 337-360.
- PERONA, J. J. & CRAIK, C. S. (1997) Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. **J. Biol. Chem.**, **272** (48), 29987-29990.
- PINHO, F. M. O. & PEREIRA, I. D. (2001) Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, **47** (1), 24-29.
- PINHO, F. M. O., OLIVEIRA, E. S. & FALEIROS, F. (2004). Acidente ofídico no estado de Goiás. **Rev. Ass. Med. Bras.**, **50** (1), 93-96.
- PINNA, M. (2001) Conrad Gesner e a sistemática biológica: há 450 anos era publicado o primeiro volume da Historia animalium. Seção Memória. **Revista Ciência Hoje**, **30** (178), 82-84.
- PROSDOCIMI, F., CERQUEIRA, G. C., BINNECK, E., SILVA, A. C., REIS, A. N., JUNQUEIRA, A. C. M., SANTOS, A. C. F., NHANI JR., A., WUSI, C. I., CAMARGO-FILHO, F., KESSEDJIAN, J. L., PETRETSKI, J. H., CAMARGO, L. P., FERREIRA, R. G. M., LIMA, R. P., PEREIRA, R. M., JARDIM, S., SAMPAIO, V. S. & FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V. (2003) Bioinformática: Manual do Usuário. **Biotechnol. Cienc. & Des.**, **29**, 18-31.
- RAGE, J. C. & ESCUILLIÉ, F. (2000) Un nouveau serpent bipède du Cénomanién (Crétacé). Implications phylétiques. **C. R. Acad. Sci. Paris**, **330**, 513-520.

- RAMOS, O. H. P. (2001) Produção de uma pró-metaloproteinase recombinante em bactéria, ativação in vitro e modelagem molecular. **Dissertação de mestrado (Universidade Federal de São Carlos), 118 p.**
- REIJMERS, T.H., WEHRENS, R., DAEYAERT, F. D., LEWI, P. J. & BUYDENS, L. M. C. (1999) Using genetic algorithms for the construction of phylogenetic trees: application to G-protein coupled receptor sequences. **Biosystems**, **49**, 31-43.
- RIEPEL, O. & ZAHER, H. (2000) The intramandibular joint in squamates, and the phylogenetic relationships of the fossil snake *Pachyrhachis problematicus* Haas. **Fieldiana (Geology)** **43**, 1-69.
- RIEPEL, O., ZAHER, H., TCHERNOV, E. & POLCYN, M. J. (2003) The anatomy and relationships of *Haasiophis terrasanctus*, a fossil snake with well-developed hind limbs from the Mid-Cretaceous of the Middle East. **J. Palaeontol.**, **77**, 536-558.
- RODRIGUES, V. M., SOARES, A. M., MANCIN, A. C., FONTES, M. R. M., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. & GIGLIO, J. R. (1998) Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp. Biochem. Phys.**, **121**, 215-222.
- ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. (2000) Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano: 1-45p. In: SOERENSEN, B. **Acidentes por animais peçonhentos: reconhecimento, clínica e tratamento**. São Paulo. Editora Atheneu, 138p.
- ROSENFELD, G., NAHAS, L. & KELEN, E. M. A. (1968) Coagulant, proteolytic, and hemolytic properties of some snake venoms. In: **Venomous Animal and Their Venoms**. Eds. BÜCHERL, W., BUCKLEY, E. & DEULOFEU, V. Academic Press, New York, 229-273.

- SAITOU, N. & NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, **4**, 406-425.
- SALDARRIAGA, M. M., OTERO, R., NÚÑEZ, V., TORO, M. F., DÍAZ, A. & GUTIÉRREZ, J. M. (2003) Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, **42**, 405-411.
- SALI, A. & BLUNDELL, T. L. (1993) Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, **234**, 779-815.
- SCHECTER, A. & BERGUER, A. (1967) On the Size of the Active Site in Proteases. **A. Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **27**, 157.
- SERRANO, S. M., MENTELE, R., SAMPAIO, C. A. & FINK, E. (1995). Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, **34**, 7186-7193.
- SERRANO, S. M., HAGIWARA, Y., MURAYAMA, N., HIGUCHI, S., MENTELE, R., SAMPAIO, C. A., CAMARGO, A. C. & FINK, E. (1998) Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur. J. Biochem.**, **251** (3), 845-853.
- SILVA JR., F. P. & DE-SIMONE, S. G. (2004) S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? **Bioorg. Med. Chem.**, **12**, 2571-2587.

- SMITH, A., MARSHALL, L. R., MIRTSCHEIN, P. J. & JELINEK, G. A. (2000) Neutralisation of the clotting activity of Australian snake venoms by snake plasma. **Toxicon**, **38**, 1855-1858.
- SNEATH, P. H. & SOKAL, R. R. (1973) **Numerical taxonomy: The Principles and Practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 573p.
- STOCKER, K., FISCHER, H. & MEIER, J. (1982) Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, **20** (1), 265-273.
- STUBBS, M. T. & BODE, W. (1995) The clot thickens... clues provided by thrombin structure. **Trends Biochem. Sci.**, **20**, 23-28.
- SWOFFORD, D. L., OLSEN, G. J., WADDELL, P. J. & HILLIS, D. M. (1996) in **Molecular Systematics**. HILLIS, D. M., MORITZ, C. & MABLE, B. K., eds. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 407-514.
- TCHERNOV, E., RIEPPEL, O., ZAHER, H., POLCYN, M. J. & JACOBS, L. L. (2000) A fossil snake with limbs. **Science**, **287**, 2010-2012.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, **22**, 4673-4680.
- TU, A. T. (1996) Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **391**, 37-62.
- UETZ, P. (2003) The EMBL reptile database. **Peter Uetz and the European Molecular Biology Laboratory**, Heidelberg, Germany.

- VIDAL, N. & HEDGES, S. B. (2004) Molecular evidence for a terrestrial origin of snakes. **Proc. R. Soc. Lond. B**, **271**, 226-229.
- VIZOTTO, L. D. (2003) **Serpente: lendas, mitos, superstições e crendices**. Editora Plêiade, 240p.
- VON DEM BORNE, P. A., BAJZAR, L., MEIJERS, J. C., NESHEIM, M. E. & BOUMA, B. N. (1997) Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis. **J. Clin. Invest.**, **99**, 2323-2327.
- WALLS, G. L. (1940) Ophtalmological implications for the early history of snakes. **Copeia** **1940**, 1-8.
- WARKENTIN, T. E. (1998) Limitations of conventional treatment options for heparin-induced thrombocytopenia. **Semin. Hematol.**, **35**, 17-25.
- WESTBROOK, J., FENG, Z., JAIN, S., BHAT, T. N., THANKI, N., RAVICHANDRAN, V., GILLILAND, G. L., BLUHM, W., WEISSIG, H., GREER, D. S., BOURNE, P. E. & BERMAN, H. M. (2002) The Protein Data Bank: unifying the archive. **Nucleic Acids Res.**, **30**, 245-248.
- WISNER, A., BRAUD, S. & BON, C. (2001) Snake venom proteinases as tools in hemostasis studies: structure-function relationship of a plasminogen activator purified from *Trimeresurus stejnegeri* venom. **Haemostasis**, **31**, 133-140.
- YANG, Z. (1996) Maximum-likelihood models for combined analyses of multiple sequence data. **J. Mol. Evol.**, **42**, 587-596.

- ZAHER, H. (1998) The phylogenetic position of *Pachyrhachis* within snakes (Squamata, Lepidosauria). **J. Vert. Paleont.**, **18**, 1-3.
- ZAHER, H. & RIEPPEL, O. (2000) A brief history of snakes. **Herpetol. Rev.**, **31**, 73-76.
- ZHANG, Y., WISNER, A., XIONG, Y. & BON, C. (1995) A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. **J. Biol. Chem.**, **270** (17), 10246-10255.

CAPÍTULO ÚNICO

Estudos biológicos e estruturais da BthaTL, uma
serinopeptidase recombinante da peçonha de
Bothrops alternatus (Viperidae, Crotalinae)

INTRODUÇÃO

As peçonhas ofídicas são constituídas por uma ampla gama de substâncias biologicamente ativas. Proteínas e peptídeos representam de 90 a 95% de seu peso seco, e os demais componentes incluem carboidratos (encontrados principalmente na forma de glicoproteínas), cátions metálicos (como zinco e cálcio, associados às metalopeptidases, e o sódio, cujo papel ainda não é bem compreendido), nucleosídeos, aminas biogênicas, além de uma pequena fração de aminoácidos livres e lipídeos (Tu, 1988).

Dentre as diversas atividades enzimáticas desempenhadas por peçonhas ofídicas está a proteólise exercida pelas serinopeptidases, moléculas que chegam a representar um quinto da composição da peçonha e atuam principalmente no sistema hemostático da vítima, na maioria das vezes mimetizando a ação da trombina e ativando a coagulação do sangue (Wisner *et al.*, 2000).

Aquelas serinopeptidases de peçonhas ofídicas que desempenham uma das funções essenciais da trombina, coagulando o fibrinogênio pela clivagem dos fibrinopeptídeos A e/ou B, são denominadas SVTLEs (**S**nake **V**enom **T**hrombin-**L**ike **E**nzymes, ou enzimas de peçonhas ofídicas com ação semelhante à da trombina).

Em grande parte dos casos, os monômeros de fibrina gerados pela ação das SVTLEs sobre as cadeias A α e/ou B β do fibrinogênio não formam ligações cruzadas entre si, devido à ausência do fator XIII da coagulação ativado. O resultado, segundo Markland (1998), são coágulos aberrantes e frouxos, que não dependem da atuação da plasmina para serem dissolvidos. Em envenenamentos comuns as SVTLEs usualmente deixam o sangue da vítima incoagulável, mas este efeito depende da concentração plasmática que a enzima possa alcançar a partir do momento em que a peçonha é injetada no local da picada.

De acordo com Maroun (2001), o significado biológico da convergência funcional verificada entre as SVTLEs e a trombina ainda não está muito claro, embora provavelmente a depleção do estoque de fibrinogênio circulante e a formação de coágulos instáveis de fibrina esteja relacionada com a necessidade da serpente imobilizar rapidamente a presa (objetivando a alimentação) ou o predador (visando à defesa) por meio da indução de hemorragias.

A possibilidade de se promover uma espécie de “desfibrinogenação terapêutica” aplicando tais observações levou à criação de remédios como Arwin™-Venacil (produzido pela Ludwigshafen à base de Ancrod, uma SVTLE da peçonha de *Calloselasma rhodostoma*) e Defibrase™ (produzido pela Pentapharm e originado da Batroxobina, uma SVTLE da peçonha de *Bothrops atrox* ou de *Bothrops moojeni*). Ambos os medicamentos são administrados por injeção intravenosa ou subcutânea, clivando o fibrinopeptídeo A e gerando monômeros de fibrina que são rapidamente degradados pela plasmina, sendo os produtos de degradação eliminados pelo sistema urinário. Isso resulta num estado de hipofibrinogenemia, enquanto plaquetas, hemácias e os demais fatores de coagulação permanecem nos níveis normais. Tais efeitos reduzem a incidência de oclusões vasculares e de trombozes pós-operatórias (Hutton & Warrell, 1993).

Algumas destas enzimas desempenham funções adicionais normalmente executadas pela trombina, como a ativação de outros fatores da coagulação, o que eleva sua importância como modelos farmacológicos para o tratamento de doenças vasculares, responsáveis por quase um terço das mortes anuais no mundo (Tebbe *et al.*, 1997). A diferença básica entre as SVTLEs e a trombina está na estrutura das enzimas de serpentes, extensivamente glicosiladas, e também nos mecanismos de ação por elas utilizados (Silva Jr. & De-Simone, 2004).

As dificuldades encontradas para purificar quantidades suficientes de uma proteína de peçonhas ofídicas visando sua caracterização biológica e cristalização são notoriamente elevadas. Para contornar tais problemas, técnicas como expressão de proteínas recombinantes e modelagem molecular baseada em homologia têm sido desenvolvidas.

A modelagem molecular baseada em homologia permite estimar a estrutura terciária da proteína de interesse a partir da sua comparação com um molde, ou seja, com a estrutura tridimensional de uma proteína cuja seqüência primária mostre elevada identidade com a da proteína cujo modelo se deseja obter. Após o alinhamento de ambas as seqüências, são aplicados programas específicos para a construção do modelo e também para a sua análise, até que se chegue a um formato considerado satisfatório dentro dos parâmetros normalmente aceitos para proteínas.

Nos dias atuais, a bioinformática também tem sido muito utilizada em estudos teóricos de reconstrução filogenética, que procuram correlacionar evolutivamente as seqüências primárias de moléculas de diferentes organismos, muitas vezes obtendo filogenias que confirmam a classificação taxonômica vigente. Embora não permitam descobrir o ancestral que deu origem a todas as moléculas investigadas, tais estudos possibilitam inferências sobre o modo pelo qual a Evolução agiu sobre elas ao longo do tempo, levando a diferentes seqüências que implicam numa ampla diversidade de ações.

Serinopeptidases de peçonhas ofídicas são conhecidas por atuarem em uma gama variada de macromoléculas, sendo que cada uma delas é mais específica para um determinado substrato (Pirkle, 1998). Sabe-se que as diferenças de especificidade derivam da divergência evolutiva que originou uma grande variedade de estruturas para as alças (“loops”) de superfície circundantes ao sítio de ligação dos substratos.

As seqüências das SVTLEs compartilham cerca de 60% de identidade entre si. Como não existem muitas estruturas terciárias determinadas experimentalmente para estas moléculas, os modelos moleculares tridimensionais gerados em computador têm se mostrado muito úteis na busca de uma explicação completa e lógica para a divergência de substratos entre essas serinopeptidases do clã da quimiotripsina (Lesk & Fordham, 1996) e da família da tripsina (Krem & Di Cera, 2001), que curiosamente apresentam o mesmo mecanismo catalítico.

No Brasil, cerca de 90% dos acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae, subfamília Crotalinae), que compreende em torno de 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional.

A espécie *Bothrops alternatus*, popularmente conhecida como “urutu”, predomina nas regiões sudeste e sul, habitando zonas rurais e periferias urbanas, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, além de locais com grande proliferação de roedores, como paióis, celeiros e depósitos de lenha (figura 24). Tem hábitos noturnos ou crepusculares, e pode agir agressivamente quando se sente ameaçada, desferindo botes sem produzir ruídos (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos da FUNASA, 2001). As

serinopeptidases presentes em sua peçonha intensificam os efeitos tóxicos gerados pelo envenenamento, gerando complicações sistêmicas especialmente por interferir na hemostasia do indivíduo picado.

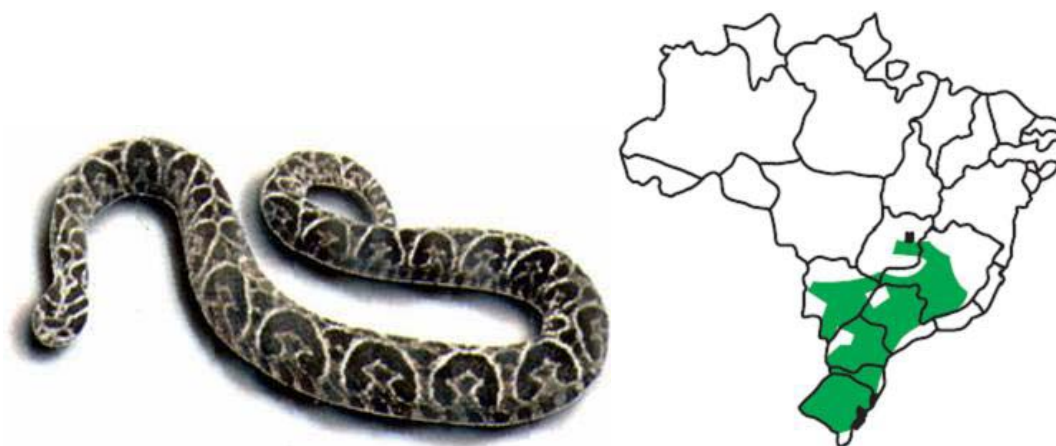


FIGURA 24 – Indivíduo adulto de *Bothrops alternatus* e área de incidência da espécie. Fonte: Manual da FUNASA, 2001.

O objetivo deste trabalho foi clonar, expressar e testar algumas atividades biológicas de uma serinopeptidase recombinante da peçonha de *Bothrops alternatus*, empreendendo paralelamente estudos teóricos de modelagem molecular baseada em homologia e de reconstrução filogenética.

MATERIAL

REAGENTE EMPREGADO NA EXTRAÇÃO DO RNA_{TOTAL} DAS GLÂNDULAS DE PEÇONHA:

- ▶ TRIzol® Reagent (Gibco BRL – Grand Island, NY, EUA)

CEPAS BACTERIANAS DERIVADAS DE E. coli:

▶ DH5-α: *F' φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-arg⁻ F) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) phoA supE44λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1* [Gibco BRL – Grand Island, NY, EUA]

▶ BL21(DE3): *F⁻ ompT hsd S_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)* [Novagen – Madison, WI, EUA]

PLASMÍDEOS:

- ▶ pGEM® -T Easy (Promega – Madison, WI, EUA)
- ▶ pET-28a (Novagen – Madison, WI, EUA)

OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (“PRIMERS”):**Primer utilizado na síntese do cDNA a partir do RNA MENSAGEIRO na RT-PCR:**

- ▶ Oligo (dT) (Amersham Pharmacia Biotech – Piscataway, NJ, EUA)

TABELA 02 – Lista dos demais oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

NOME	SEQÜÊNCIA
Forward	5' CGGGATCC GTIATIGGI GGIGATGAAT 3' Sítio de restrição da enzima <i>Bam</i> HI
3'UTR Reverse	5' CGGAATTC TAACCTTTTCAAAGGTTT 3' Sítio de restrição da enzima <i>Eco</i> RI
T7 promotor (F)	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
T7 terminador (R)	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'
SP6 terminador (R)	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'

OBS: O oligonucleotídeo forward (F) equivale à pequena porção 5' da fita do DNA ou do RNA que codifica a proteína (fita molde). O oligonucleotídeo reverse (R) equivale à porção 5' da fita de DNA complementar àquela que codifica a proteína.

ENZIMAS:**TABELA 03** – Lista das enzimas de restrição empregadas.

NOME	TIPO DE RESTRIÇÃO	SEQÜÊNCIA DE RECONHECIMENTO
<i>Eco</i> RI*	S	5'... G/AATTC ...3'
<i>Bam</i> HI*	S	5'... G/GATCC ...3'
<i>Pst</i> I**	S	5'... CTGCA/G ...3'

*Gibco BRL – Grand Island, NY, EUA

** New England Biolabs, Inc.

OBS: A restrição do tipo S (sticky) gera extremidades coesivas no DNA.

Enzimas utilizadas, respectivamente, na síntese, amplificação e clonagem do cDNA:

- ▶ Taq DNA polimerase (Promega – Madison, WI, EUA)
- ▶ T4 DNA ligase (Promega – Madison, WI, EUA)

ANTICORPOS

▶ Anti-BthaTL: origem policlonal, obtido pela imunização de camundongos utilizando uma serinopeptidase homóloga (Batroxobina, código JO2684 no Genbank).

▶ Anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co. – St. Louis, MO, EUA).

MARCADORES DE MASSA MOLECULAR:

PARA DNA:

- ▶ High DNA MassTM Ladder (Gibco BRL – Grand Island, NY, EUA)
- ▶ Low DNA MassTM Ladder (Gibco BRL – Grand Island, NY, EUA)

PARA PROTEÍNAS:

- ▶ Benchmark Prestained Protein Ladder (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA)
- ▶ Marcador de Massa Molecular (12-66 kDa)

MATERIAL PARA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE:

- ▶ Talon Metal Affinity Resin (BD Clontech, EUA)

MEMBRANAS / FILTROS PARA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA:

- ▶ Membrana de nitrocelulose Hybond™-C (Amersham Life Science)
- ▶ Membrana “Immobilion PVDF” (Millipore – San Clemente, CA, EUA)
- ▶ Centriprep-10 (Amicon, Inc. – Berveley, MA, EUA)

SUBSTRATOS PARA PROTEÓLISE:

- ▶ Fibrinogênio bovino (Sigma Chemical Co. – St. Louis, MO, EUA)
- ▶ Caseína (Sigma Chemical Co. – St. Louis, MO, EUA)

“KITS”:

- ▶ Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq* (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA): para síntese e amplificação inicial do cDNA de interesse.
- ▶ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega – Pittsburgh, PA, EUA): para purificação de fragmentos de cDNA a partir do gel de agarose.
- ▶ Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega – Pittsburgh, PA, EUA): para o isolamento do DNA plasmidial.
- ▶ Bio-Rad Protein Assay (Bio Rad – Hercules, CA, EUA): para dosagem protéica baseada no método de Bradford (Bradford, 1976).

OUTROS REAGENTES:

Todos os demais reagentes utilizados neste trabalho possuíam grau de pureza analítico, ou seja, confiável para análises.

METODOLOGIA

ESTUDOS BIOLÓGICOS

EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS DE PEÇONHA

Uma serpente macho da espécie *Bothrops alternatus*, com aproximadamente três anos de idade e medindo cerca de cinquenta centímetros, foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Augusto Shinya Abe (UNESP, Rio Claro). Alimentada a cada vinte dias com um camundongo, ela estava em boas condições de saúde. Três dias antes do sacrifício, sua peçonha havia sido extraída manualmente, para estimular a produção de RNAs mensageiros nas células glandulares.

O animal foi retirado da caixa com um gancho e colocado no interior de um saco plástico preenchido por gás carbônico, que exerceu um efeito anestésico imediato. Então foi realizada uma incisão lateral na pele escamada da maxila, nos lados direito e esquerdo, para a extração das glândulas, que foram separadas de uma camada de tecido muscular, cortadas em suas extremidades (ductos), colocadas em um pequeno recipiente, pesadas e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, a serpente foi decapitada e as duas glândulas de peçonha foram armazenadas no ultrafreezer a uma temperatura de -86°C.

OBTENÇÃO DO RNA TOTAL

Uma das glândulas de peçonha foi imersa no reagente TRIzol® (100 mg/ml), de acordo com o método proposto por Chomczynski & Sacchi, em 1987, com algumas modificações.

Resumidamente, o tecido glandular foi homogeneizado no reagente e centrifugado, seguindo-se adição de clorofórmio ao sobrenadante e centrifugação do mesmo para a separação de três fases; adição de isopropanol à fase superior para a precipitação do RNA; lavagem com etanol a 75% e dissolução do RNA obtido em água livre de RNases (tratada por uma noite com DEPC a 0,1% e posteriormente autoclavada).

MONITORAMENTO DO ISOLAMENTO DO RNA TOTAL

O RNA total obtido foi monitorado quanto ao grau de pureza e concentração. Para determinar a concentração, foi lida a absorbância do RNA total diluído em água desionizada estéril a 260 nm num espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech). O valor de leitura obtido foi aplicado na seguinte equação:

$$[\text{RNA}] = \text{D.O.} \times \text{Fator de Diluição} \times \text{Fator de Correção}$$

Onde:

[RNA] = Concentração do RNA total na solução testada

D.O. = Absorbância da solução no comprimento de onda de 260 nm

Fator de Diluição = Número de vezes em que a solução de RNA total foi diluída para a obtenção do volume final. Por exemplo, 4 µl da solução de RNA total em 996 µl de água desionizada estéril resulta num fator de diluição igual a 250.

Fator de Correção = Número constante relativo à solução de RNA para fins de cálculos de concentração. No comprimento de onda igual a 260 nm, o valor é igual a 40.

O grau de pureza do RNA total foi estimado por uma relação direta entre a absorbância da solução a 260 e a 280 nm, lidas no mesmo espectrofotômetro.

$$\frac{\text{D.O. 260nm}}{\text{D.O. 280nm}}$$

Quando o valor obtido por esta relação é próximo de 2, há total predominância de ácidos nucleicos em relação a um eventual contaminante protéico.

Para a verificação da integridade do RNA total por meio da visualização de suas bandas características, 10 µl da amostra foram aplicados num gel de agarose com formaldeído.

O RNA total extraído foi então armazenado num ultrafreezer a -86°C, e todos os procedimentos foram realizados mediante o uso de luvas cirúrgicas e com material esterilizado, lavado com água tratada com DEPC e autoclavado, para evitar a degradação do RNA pela ação das RNases.

ELETROFORESES EM GEL DE AGAROSE

As soluções de cDNA foram analisadas por meio de eletroforeses em gel de agarose a 1%, reveladas com brometo de etídeo conforme descrito por Sambrook *et al.* em 1989, e visualizadas com o auxílio de um transiluminador UV (Ultra Violet Products) num comprimento de onda igual a 302 nm. Os géis foram digitalizados com uma câmera digital Kodak CD120. O programa Kodak Digital Science 1D permitiu estimar o tamanho dos cDNAs e a concentração de suas bandas.

Já as soluções de RNA total foram desnaturadas pela adição de formamida e aplicadas num gel de agarose contendo formaldeído, segundo as instruções de Sambrook *et al.* (1989). O formaldeído se liga aos resíduos de guanina do RNA, impedindo que as bases nitrogenadas deste ácido nucléico se pareiem com outras, formando duplas fitas de RNA, o que mascararia a sua migração no gel. Após a corrida das amostras, sua revelação, visualização e digitalização seguiram os passos descritos para as amostras de cDNA.

DESENHO DOS PRIMERS UTILIZADOS, SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO INICIAL DO cDNA CODIFICANTE DA BthTL

A região N-terminal da Batroxobina (enzima desfibrinogenante da peçonha de *Bothrops atrox* e de *Bothrops moojeni*) deduzida por Itoh *et al.* em 1987 serviu de

base para o desenho do primer forward (Tabela 04, Figura 25). Lançada no programa BLAST, a seqüência de 10 resíduos de aminoácidos mostrou elevada identidade com a região N-terminal de outras serinopeptidases trombina-símile de peçonhas ofídicas (Tabela 04).

Uma seqüência consenso da região 3'UTR dessas serinopeptidases foi utilizada como molde para a determinação da seqüência do primer reverse (Tabela 04, Figura 25), correspondente à região 5' da fita complementar àquela que codifica a proteína.

TABELA 04 – Seqüência dos 10 primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal e dos 18 nucleotídeos iniciais da região 3'UTR, imediatamente posteriores ao sítio de terminação de tradução ATG, de algumas serinopeptidases de peçonhas ofídicas com atividade semelhante à da trombina. A seqüência em vermelho serviu de base para a síntese do primer forward. O primer reverse foi concebido a partir dos nucleotídeos iniciais da seqüência 3'UTR conservada.

PROTEÍNA	ESPÉCIE	N-terminal	Nucleotídeos 3'UTR
Batroxobin	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops moojeni</i>	V I G G D E C D I N	AAA CCT TTG AAA AGG TTA
Bothrombin	<i>Bothrops jararaca</i>	V I G G D E C D I N	
Ancrod	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	V I G G D E C N I N	
Flavoxobin	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	V I G G D E C N I N	AAA CTT TTG AAA AAG TTA
Mucofirse 5	<i>Probothrops mucrosquamatus</i>	I I G G D E C N I N	
Bilineobin	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	I I G G D E C N I N	
Contortrixobin	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	V V G G D E C N I N	
KN-BJ2	<i>Bothrops jararaca</i>	I I G G R P C D I N	AAA CTT TTG AAA AAG TTA
TSV-PA	<i>Trimeresurus stejnejeri</i>	V F G G D E C N I N	AAA CTT TTG AAA AAG TTA

Os primers foram desenhados com o programa Gene Runner (Hastings Software Inc., 1994), que converte os resíduos de aminoácidos em seus códons correspondentes, mostrando inclusive as degenerações, sendo acrescentados os sítios de restrição para a enzima *Bam*HI na extremidade 5' do primer forward e para a enzima *Eco*RI na extremidade 5' do primer reverse.



FIGURA 25 – Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do cDNA codificante da BthaTL, a partir do cDNA da Batroxobina: ■ nucleotídeos, ■ códon de iniciação, ■ códon de terminação, ■ oligonucleotídeo utilizado na amplificação + ■ sítio de restrição para a enzima BamHI ou ■ sítio de restrição para a enzima EcoRI, ■ resíduos de aminoácidos. As setas mostram o sentido da amplificação.

A síntese e a amplificação inicial do cDNA de interesse foram realizadas por meio de uma RT-PCR (**R**everse **T**ranscriptase coupled with the **P**olimerase **C**hain **R**eaction, ou reação em cadeia da polimerase associada à ação da transcriptase reversa), utilizando o kit Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq*.

TABELA 05 – Componentes do kit “Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq*” empregados na síntese e amplificação inicial do cDNA de interesse. As concentrações foram determinadas após a adição dos demais reagentes necessários até o volume final de 50 µl.

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
2x Reaction Mix *	25 µl	1x
RNA total (1 µg/µl)	1 µl	0.02 µg/µl
Primer forward (10 µM)	1 µl	0.02 µM
Primer reverse (10 µM)	1 µl	0.02 µM
RT Platinum Taq Mix **	1 µl	Não determinada
H ₂ O livre de RNases	21 µl	

* Consiste num tampão otimizado para a transcrição reversa e amplificação por PCR, composto por íons Mg⁺², desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e estabilizadores.

** Contém uma mistura da transcriptase reversa SuperScript™ II e da *Taq* DNA polimerase para síntese otimizada de cDNA e sua amplificação.

As condições ideais para a RT-PCR foram providenciadas por meio de um termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer):

- ▶ 50°C por 22 minutos e 30 segundos (síntese do cDNA);
- ▶ 94°C por 2 minutos (inativação da transcriptase reversa e desnaturação dos complexos de RNA-cDNA);
- ▶ 40 ciclos:
 - 94°C por 15 segundos (desnaturação da dupla fita de cDNA);
 - 57°C por 30 segundos (anelamento dos primers nas fitas-molde);
 - 70°C por 1 minuto (extensão);

- ▶ 72°C por 7 minutos e 30 segundos (inativação da *Taq* DNA polimerase);
- ▶ 4°C por tempo indeterminado (∞).

O produto do RT-PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% para DNA e devidamente documentado.

REAMPLIFICAÇÃO DO cDNA DE INTERESSE POR PCR

Visando aumentar a concentração do cDNA de interesse, este foi utilizado como molde para uma reação de PCR, como descrito na tabela abaixo:

TABELA 06 – Reação de reamplificação do provável cDNA codificante da proteína de interesse.

REAGENTES	VOLUMES UTILIZADOS
cDNA molde (4,6 ng/ μ l)	1 μ l
MgCl ₂ 25 mM	3 μ l
Primer forward (10 mM)	5 μ l
Primer reverse (10 mM)	5 μ l
Tampão <i>Taq</i> DNA polimerase (10x)	5 μ l
PCR Mix Nucleotídeos (10 mM)	1 μ l
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O livre de nucleases	29,5 μ l
TOTAL	50 μl

As condições da reação, realizada no mesmo termociclador descrito para a RT-PCR, foram as seguintes:

- ▶ 94°C por 5 minutos;
- ▶ 30 ciclos:
 - 92°C por 45 segundos (desnaturação da dupla fita de cDNA);
 - 65°C por 1 minuto (anelamento dos primers nas fitas-molde);
 - 72°C por 1 minuto (extensão);

- ▶ 72°C por 7 minutos (inativação da *Taq* DNA polimerase);
- ▶ 4°C por tempo indeterminado (∞).

Cerca de 2 μ l do produto da PCR foram aplicados num gel de agarose a 1% para DNA. Após a corrida, a banda de interesse foi quantificada, e o cDNA armazenado a – 20°C.

VETOR DE CLONAGEM

O vetor pGEM®-T Easy (Figura 26) é um sistema conveniente para a clonagem de produtos de PCR, pois apresenta uma timidina em suas terminações 3' que se pareia com a desoxiadenosina das extremidades 3' do cDNA produzido pela ação da *Taq* DNA polimerase, prevenindo assim sua própria recircularização.

Ele contém os promotores T7 e SP6 da RNA polimerase, que flanqueiam um sítio de clonagem múltipla dentro da região codificante da enzima β -galactosidase. A inserção de fragmentos nessa região permite a análise direta dos clones recombinantes por verificação da ausência da atividade de β -galactosidase sobre o substrato sintético X-gal. A existência de muitas seqüências de restrição no sítio de clonagem múltipla permite a liberação do inserto pela adição de uma simples enzima, ou mesmo de duas enzimas diferentes.

PROCEDIMENTO PARA INSERÇÃO DE UMA DEOXIADENOSINA LIVRE NA EXTREMIDADE 3' DO cDNA AMPLIFICADO

Segundo especificações técnicas, a enzima *Taq* DNA polimerase termoestável utilizada para amplificar o cDNA de interesse era dotada de atividade “prova de leitura”, gerando extremidades “cegas” durante a amplificação por PCR. Como consequência, múltiplas inserções poderiam ocorrer no processo de clonagem. Para

garantir a ligação de apenas um inserto por molécula de vetor, foi aplicado um método de adição de uma desoxiadenosina livre na extremidade 3' do inserto.

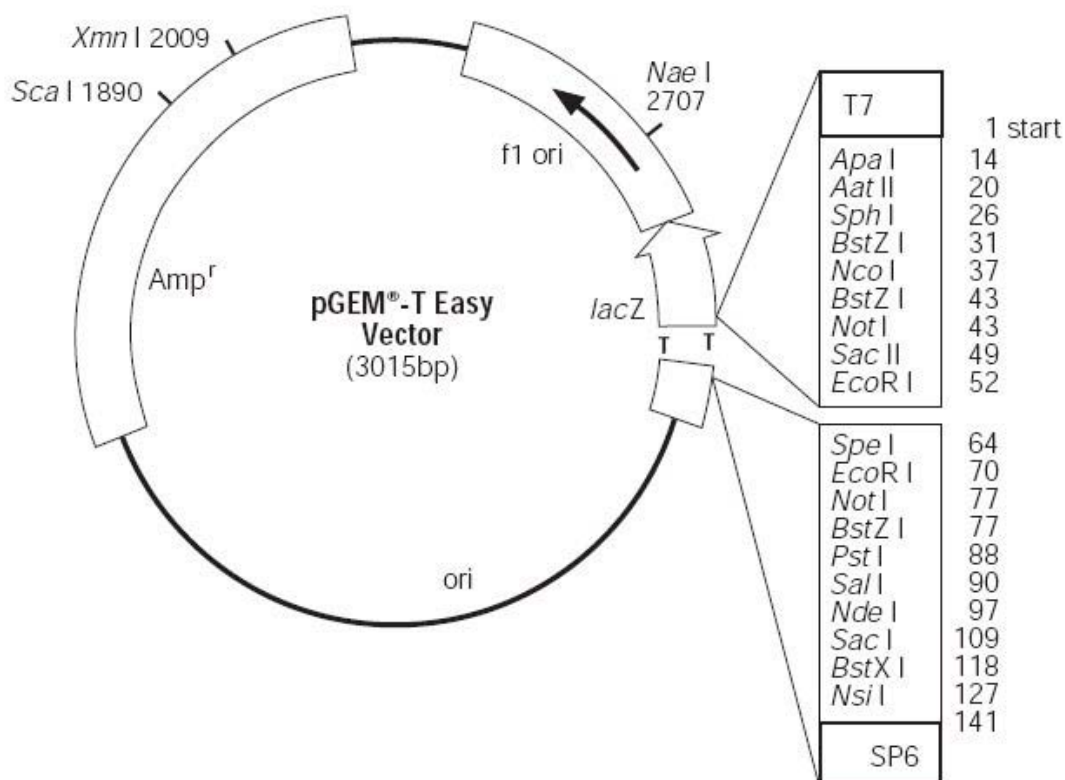


FIGURA 26 – Mapa circular do vetor pGEM®-T Easy, retirado do Manual Técnico.

5 µl do inserto amplificado na PCR receberam 1 µl do tampão de reação da enzima *Taq* DNA polimerase 10x com cloreto de magnésio, 1 µl de dATP a 10mM e 1 µl (5 unidades) da enzima *Taq* DNA polimerase. A solução foi levada a 10 µl finais com a adição de água desionizada estéril, sendo incubada a 70°C por 30 minutos, deixando o inserto pronto para ser ligado ao vetor de clonagem.

LIGAÇÃO DO INSERTO NO VETOR DE CLONAGEM

A reação de ligação foi montada respeitando-se a proporção 1:3 entre vetor e inserto, utilizando-se a enzima T4 DNA ligase na presença de ATP, e deixada durante uma noite num banho a 16°C. O produto de ligação foi usado para transformar células competentes de *E. coli*, objetivando a amplificação clonal do sistema.

TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES COM O VETOR DE CLONAGEM

Foi utilizada a linhagem DH5- α de *E. coli* nos ensaios de transformação. A preparação de células competentes foi realizada a partir de culturas crescidas durante a noite na temperatura de 37°C e sob agitação de 250 rpm, com D.O.₆₆₀ entre 0,4 e 0,6.

Empregou-se a solução de CaCl₂ 50 mM na transformação das bactérias pela técnica do choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989).

A verificação de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) transformadas foi baseada no crescimento de colônias em meio seletivo contendo ampicilina (50 mg/ml) e em placas de LB ágar contendo ampicilina, IPTG e X-gal, nas quais a cor de cada colônia determina se ela é ou não recombinante, assim como na análise de restrição do DNA plasmidial dos clones resistentes e transformados.

Para o isolamento do DNA plasmidial foi utilizado o kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System”. As enzimas *EcoRI* e *Pst* I foram empregadas na restrição dos plasmídeos obtidos de possíveis transformantes. O DNA restrito foi então analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%, devidamente digitalizado após a corrida.

Cerca de 10 μ l do DNA plasmidial obtido de uma colônia que se mostrou um provável clone positivo foram submetidos a seqüenciamento.

VETOR DE EXPRESSÃO

O vetor pET-28a (Figura 27) apresenta as seguintes características: resistência ao antibiótico canamicina; região promotora do fago T7 (que é reconhecida pela T7 RNA polimerase, o que potencializa a transcrição após indução com IPTG); sítios múltiplos de clonagem sob o controle do promotor citado; seqüência consenso GAAGGA para ligação do RNA mensageiro transcrito ao ribossomo, aumentando o nível de tradução; seqüência para a tradução de poli-histidinas em um peptídeo de fusão, facilitando a purificação da proteína recombinante por cromatografia de quelação de metal em resina de níquel; e seqüência para tradução do sítio de clivagem por trombina, possibilitando a remoção do peptídeo fundido.

A eficiência do vetor é beneficiada pela combinação com a linhagem BL21(DE3) de *E. coli* que, na presença do indutor (IPTG), desreprime a transcrição da T7 RNA polimerase a partir do DNA genômico, aumentando a produção da enzima. A T7 RNA polimerase, com velocidade superior à da polimerase bacteriana, atua no plasmídeo pET-28a, transcrevendo grandes quantidades de RNA mensageiro relativo à proteína recombinante de interesse em fusão com o peptídeo que viabilizará sua purificação.

SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO

20 µl do mesmo DNA plasmidial extraído das células DH5-α e enviado para seqüenciamento foram submetidos à digestão por 2 horas a 37°C com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. O produto da digestão foi aplicado num gel de agarose a 1% para DNA, e a banda correspondente ao inserto foi cortada e eluída com o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System”.

O vetor de expressão pET-28a foi digerido com as mesmas enzimas de restrição, *BamHI* e *EcoRI*, sendo posteriormente purificado por meio da eluição de bandas obtidas com o mesmo kit indicado acima, após eletroforese em gel de agarose.

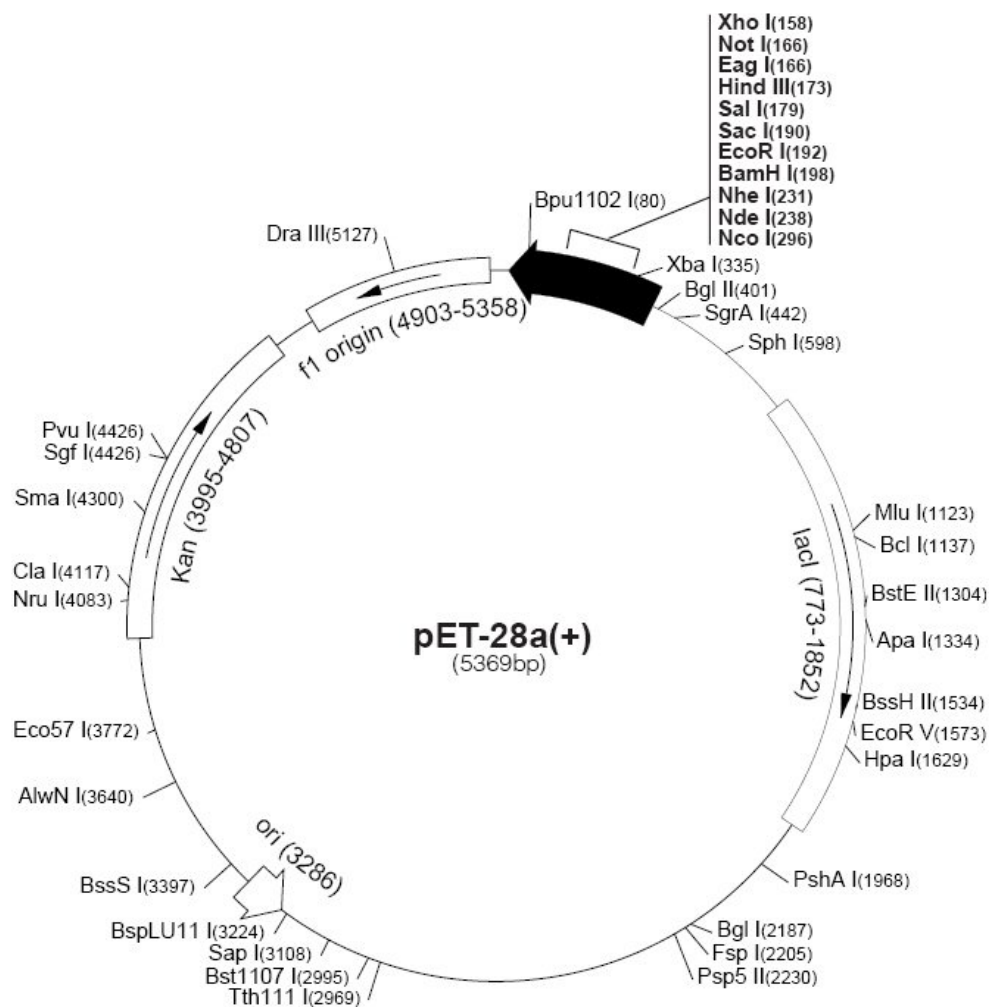


FIGURA 27 – Mapa circular do vetor pET-28a. Imagem obtida no Manual Técnico do mesmo.

A subclonagem foi efetuada após ligação de inserto e vetor, seguindo a proporção respectiva de 3:1, pela ação da enzima T4 DNA ligase a 16°C por uma noite. O produto da ligação foi utilizado na transformação de células competentes da linhagem DH5- α de *E. coli*, visando a amplificação clonal do novo plasmídeo, pBthaTL.

TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES COM O VETOR RECOMBINANTE pBthaTL

Foi realizada nos mesmos moldes descritos para o vetor de clonagem, exceto pelo fato de que, após a amplificação clonal inicial do plasmídeo pBthaTL em células da linhagem DH5- α de *E. coli*, ele foi extraído por meio de miniprep e utilizado na transformação de células competentes da cepa BL21(DE3), visando otimizar a expressão da proteína de interesse.

A verificação das unidades formadoras de colônias da cepa BL21(DE3) de *E. coli* transformadas foi baseada no crescimento de colônias em meio seletivo contendo canamicina (30 mg/ml) e em sua análise de restrição. O DNA plasmidial foi isolado via miniprep, restrito com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI e aplicado num gel de agarose a 1% para DNA, devidamente documentado.

Uma amostra do DNA plasmidial de um provável clone positivo também foi submetida a seqüenciamento.

SEQÜENCIAMENTO DO INSERTO CLONADO NOS VETORES pGEM®T-Easy E pET-28a

Foi gentilmente realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular Estrutural do Instituto de Física da USP de São Carlos sob a supervisão do Prof. Dr. Otávio Thiemann, utilizando um seqüenciador automático ABI Prism 377TNA Sequencer (Perkin Elmer).

Os oligonucleotídeos iniciadores aplicados na PCR da primeira amostra foram o T7 promotor e o SP6 terminador. Para a segunda, foram utilizados os primers T7 promotor e o T7 terminador. A concentração de primers utilizada foi de 5 pmoles/ μ l, e de cDNA molde, de 100 ng/ μ l.

ELETROFORESES EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A expressão, a purificação parcial e a renaturação (“refolding”) da BthaTL foram acompanhadas por eletroforese em gel contendo 15% de poliacrilamida em condições desnaturantes (Laemmli, 1970).

As bandas protéicas foram reveladas com o corante Coomassie Brilliant Blue R-250.

ENSAIOS DE EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE

Culturas de *E. coli* BL21(DE3) contendo o vetor recombinante foram crescidas a 37°C em meio seletivo contendo canamicina (30 mg/ml) até que a D.O._{660nm} estivesse entre 0.4 e 0.6.

Coletou-se uma amostra de 1 ml (T0) para verificação da expressão protéica basal, e a seguir a transcrição do DNA plasmidial foi induzida pela adição de IPTG para uma concentração final de 1 mM. Passadas três horas da indução, coletou-se outra amostra de 1 ml (T3) e o restante da cultura foi centrifugado. As células foram ressuspensas em tampão de ligação (imidazol a 5 mM, NaCl a 0,5M e Tris-HCl pH 7.9 a 20 mM) e lisadas pela técnica de sonicação alternada com o método de congelamento-descongelamento.

Para verificação da solubilidade da proteína de interesse, centrifugou-se o lisado e o sobrenadante gerado (S1) foi recolhido. O precipitado (PPT) foi solubilizado em tampão de ligação desnaturante (adicionado de uréia a 6M).

Posteriormente à incubação de 1 hora a 4°C, o material foi centrifugado mais uma vez. O novo sobrenadante (S2) foi armazenado, assim como o precipitado. As alíquotas coletadas ao longo do processo receberam a adição do tampão da amostra [Tris HCl 1,25M pH 6.8, SDS a 10% (p/v), glicerol a 30% (v/v), azul de bromofenol a 0.1% (p/v) e β -mercaptoetanol a 15% (v/v)] e foram então analisadas por meio de eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A quantificação protéica da fração S2 foi realizada conforme o método proposto por Bradford em 1976.

PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A fração S2, que continha a proteína de interesse solubilizada, foi fracionada sob condições desnaturantes em resina de cobalto (cromatografia de quelação de metal) sob fluxo constante de 1 ml/min. A afinidade dos resíduos de histidina (presentes no peptídeo de fusão N-terminal da proteína recombinante) por íons metálicos como o cobalto fez com que a proteína de interesse ficasse retida na coluna enquanto as demais eram removidas.

A coluna foi previamente equilibrada com 3 volumes do tampão de ligação desnaturante, também empregado na primeira lavagem após a passagem da amostra (S2). Para remover as proteínas ligadas com menor afinidade à coluna, foi utilizado o tampão de lavagem (contendo 20 mM de imidazol).

Finalmente, para a remoção das proteínas firmemente ligadas ao cobalto, foi aplicado o tampão de eluição desnaturante, com 1M de imidazol. As frações de 4 ml foram coletadas com o auxílio de um coletor automático (Pharmacia).

IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA PURIFICADA

A proteína recombinante foi analisada em gel de poliacrilamida a 15% com agente desnaturante (SDS-PAGE). Terminada a eletroforese, as amostras foram imediatamente transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Life Science), a qual foi tratada com solução de bloqueio (leite desnatado a 5% e Tween 20 a 0,5% em TBS 1x) por 1 hora sob agitação suave, posteriormente lavada com TBS 1x (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 0,24M) e incubada por 1 hora com anticorpo policlonal específico produzido em camundongos contra uma serinopeptidase homóloga isolada da peçonha de serpente *Bothrops moojeni*.

Após uma segunda lavagem com TBS 1x, a membrana foi incubada com um segundo anticorpo, anti-IgG de camundongos conjugado com a enzima fosfatase alcalina. Procedeu-se outra lavagem e finalmente a membrana foi revelada em solução contendo BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato de p-toluidina), um substrato cromogênico, na presença de NBT (cloreto de nitroblue tetrazólio).

RENATURAÇÃO POR MEIO DE DIÁLISES

Objetivando a recuperação da atividade enzimática da proteína de interesse, foi promovida a remoção gradativa do agente desnaturante com diálises sucessivas.

Inicialmente, os 10 ml da proteína parcialmente purificada em tampão de eluição com uréia a 6M foram dialisados por 1 hora contra 1 litro de solução aquosa de uréia a 3M. Em seguida, a proteína de interesse foi dialisada contra 1 litro de solução aquosa de uréia a 1M. A etapa final consistiu na diálise da proteína de interesse contra água estéril.

Os 15 ml da solução protéica obtida, livre do agente desnaturante, foram concentrados para cerca de 1 ml por meio do sistema de filtração Centriprep-10 (Amicon, Inc.), que tem nível de corte de 10 kDa. A quantidade de proteína obtida foi estimada pelo método de Bradford (1976).

SEQUENCIAMENTO N-TERMINAL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A amostra contendo a proteína recombinante BthaTL foi aplicada num gel de poliacrilamida a 10% com agente desnaturante, ao lado do Benchmark Prestained Protein Ladder (Invitrogen). Terminada a corrida, a amostra foi transferida para uma membrana de PVDF (Millipore) tratada previamente imersa em metanol e no tampão de transferência (Tris 48mM, Glicina 39mM, pH 9.0 e metanol a 20%). Após 1 hora de incubação, a membrana foi corada em Coomassie Brilliant Blue a 0,025% e metanol a 40% por 5 minutos. A área correspondente à banda de interesse foi então recortada.

Com o objetivo de confirmar os resíduos de aminoácidos que constituem a proteína recombinante BthaTL, utilizou-se o processo químico de clivagem proposto por Edman e Begg em 1967.

A banda recortada da membrana de PVDF foi aplicada num seqüenciador automático de proteínas (modelo PPSQ-23a da Shimadzu Corporation, Japão). Inicialmente, o grupo amínico do resíduo N-terminal da cadeia polipeptídica reagia

com o PITC (fenilisotiocianato), sendo o resíduo removido pelo TFA (anidro), sem degradar o restante da cadeia polipeptídica.

O aminoácido derivado da reação com PITC, chamado ATZ-aminoácido (anilinothiazolinona-aminoácido) era convertido a PTH-aminoácido (feniltiohidantoína-aminoácido), o qual era submetido a uma cromatografia, identificado por sua absorbância a 269 nm e quantificado num sistema de HPLC (coluna PTH C18), com base em um padrão de 10 pmoles de PTH-aminoácidos.

ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA

A análise da atividade da proteína (1,5 μ M) foi realizada por meio de incubação a 37°C, por 1 hora e por 3 horas, em solução de fibrinogênio (0,9 mg/ml em Tris-HCl 0,1M, pH 8.5). A incubação de 3 horas foi realizada de forma isolada ou na presença do inibidor de serinopeptidases PMSF a 1,7 mM.

Para verificação da integridade das cadeias α , β e γ do fibrinogênio após as referidas incubações, as reações foram interrompidas pela adição do tampão da amostra [Tris-HCl 0,06M pH 6.8, SDS a 2% (m/v), β -mercaptoetanol a 5% (v/v), azul de bromofenol a 0,005% (m/v) e glicerol a 10% (v/v)], aquecidas a 100°C por 2 minutos, e 15 μ l de cada amostra foram aplicados numa SDS-PAGE.

ATIVIDADE CASEINOLÍTICA

Amostras contendo 10 μ g da proteína de interesse foram incubadas a 37°C por 1 hora e por 3 horas (na presença e na ausência de PMSF a 1,7 mM) com 50 μ l de uma solução de caseína (3 mg/ml) diluída em Tris-HCl 0,05M pH 7.8.

A reação foi interrompida pela adição do mesmo tampão da amostra utilizado na atividade fibrinogenolítica. Em seguida as amostras foram aquecidas a 100°C por 2 minutos e aplicadas numa SDS-PAGE.

BIOINFORMÁTICA

DEDUÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DA BthaTL

Com o auxílio do programa Gene Runner (Hastings Software Inc., 1994), a estrutura primária da proteína recombinante de interesse, denominada BthaTL (enzima com provável ação semelhante à da trombina da peçonha de *Bothrops alternatus*), foi deduzida a partir dos códons determinados pelo seqüenciamento.

DETERMINAÇÃO TEÓRICA DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA BthaTL RECOMBINANTE

As propriedades químicas e físicas da BthaTL recombinante, desconsiderando o peptídeo de fusão, foram preditas com base em sua seqüência primária pela análise Proteparam Tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>, Ikai, 1980; Guruprasad & Reddy, 1990).

Foram analisadas as seguintes características: ponto isoelétrico (pI), índice alifático e grande média de hidropaticidade (GRAVY).

O índice alifático é definido como o volume relativo de uma proteína ocupado por cadeias laterais abertas ou alifáticas (alanina, valina, isoleucina e leucina). Segundo Ikai (1980), o índice alifático de proteínas de bactérias termofílicas é significativamente maior que o das proteínas de outros organismos. Portanto, quanto maior for este índice, maior será a termoestabilidade de proteínas globulares.

O termo “hidropatia” faz referência à repulsão de determinado resíduo de aminoácido por moléculas de água. Quando o resíduo é polar, sua hidropatia assume valor negativo. Se o resíduo for apolar, sua hidropatia é positiva. A grande média de hidropaticidade de uma proteína ou peptídeo é calculada pela soma dos valores de hidropatia de todos os seus aminoácidos, dividida pelo número de resíduos presentes na seqüência (Kyte & Doolittle, 1982).

BUSCA DE MOTIVOS

A palavra “motivo” é empregada para descrever tanto superestruturas de α -hélices ou de folhas β (Branden & Tooze, 1991) quanto seqüências consenso de aminoácidos identificadas em diversas proteínas, geralmente implicando em similaridades na estrutura terciária.

Na busca de motivos para a proteína recombinante BthaTL empregou-se o programa PROSITE (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/prosite-search-de>), que detecta, entre outros, potenciais sítios de fosforilação, glicosilação e N-miristoilação.

A adição de um grupo fosfato a uma proteína eucariótica pelas chamadas “proteínas quinase” geralmente tem função regulatória. Vários aminoácidos podem ser fosforilados, sendo a serina o mais comum, seguido pela treonina. A fosforilação de tirosinas é relativamente rara, enquanto histidinas e aspartatos são fosforilados em vias sinalizadoras de procariotos.

As proteínas quinase dependentes de cAMP e de cGMP têm preferência em fosforilar resíduos de serina e treonina próximos a pelo menos dois resíduos N-terminais básicos (Feramisco *et al.*, 1980; Glass & Smith, 1983; Glass *et al.*, 1986).

A caseína quinase II (CK-2) é uma serina/treonina quinase cuja atividade é independente de nucleotídeos cíclicos e de cálcio. Ela fosforila uma ampla gama de proteínas, e sua atividade é ótima quando existem resíduos ácidos (como Asp ou Glu) C-terminais imediatamente posteriores ao sítio acceptor de fosfatos, especialmente na posição +3 (Pinna, 1990).

Kishimoto *et al.* (1985) e Woodget *et al.* (1986) afirmaram que a proteína quinase C fosforila preferencialmente resíduos de serina ou treonina próximos a um resíduo C-terminal básico. A presença de resíduos básicos adicionais, N ou C-terminais em relação ao aminoácido alvo acelera a reação de fosforilação.

As seqüências Asn-Xaa-Ser/Thr são potenciais sítios de glicosilação protéica (Marshall, 1972). Mas a presença deste tripeptídeo consenso não é suficiente para que o resíduo de Asn seja efetivamente glicosilado, pois o padrão de enovelamento da proteína tem um papel essencial na N-glicosilação (Pless & Lennarz, 1977). Gavel & Von Reijne (1990) e Bause (1983) mostraram que a presença de uma prolina entre

os resíduos de Asn e Ser/Thr ou após este último geralmente inibe a adição de um carboidrato à proteína. Miletich & Broze Jr. (1990), demonstraram experimentalmente que a proteína C do plasma apresenta um sítio de glicosilação em que os resíduos de Ser/Thr foram substituídos por uma cisteína.

Um considerável número de proteínas eucarióticas recebe covalentemente um miristato (ácido graxo saturado de 14 carbonos) em seu resíduo N-terminal via ligação amídica (Towler *et al.*, 1988; Grand, 1989). Este sítio de N-miristoilação normalmente é uma glicina, havendo algumas restrições para os resíduos que ocupam as posições de 2 a 6. O programa inclui os resíduos de glicina internos à sequência potencialmente miristoiláveis, que poderão se tornar resíduos N-terminais na proteína madura após processamento proteolítico.

MODELAGEM MOLECULAR BASEADA EM HOMOLOGIA

A sequência primária deduzida para a BthaTL foi empregada na pesquisa de homologias locais utilizando o programa BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), restringindo a pesquisa àquelas proteínas com estrutura tridimensional resolvida e aplicando a matriz de substituição BLOSUM 62.

Para o alinhamento das sequências da BThaTL e do molde selecionado, a enzima ativadora de plasminogênio da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-PA), foi utilizado o servidor MultiAlin (<http://www.protein.toulouse.inra.fr/multialin.htm>).

Na modelagem molecular da proteína de interesse aplicou-se o programa MODELLER 6v2 (Sali & Blundell, 1993, <http://guitar.rockefeller.edu/modeller>).

AValiação da Qualidade do Modelo Gerado

Para avaliar a qualidade do modelo gerado (verificação da normalidade) foram usados os programas WHAT IF (Vriend, 1990) e PROCHECK (Laskowski, 1993),

rodando localmente em estações Linux ou Unix, ou então pelo servidor (<http://biotech.embl-heidelberg.de:8400/cgi-bin/sendquery>).

No programa WHAT IF foi selecionado o método QUALITY, cujo algoritmo analisa a vizinhança de átomos relativa a cada tipo de resíduo, sobrepondo-o a um grupo de átomos representativo deste tipo. As saídas geradas são desvios em relação à média para cada resíduo e um resultado global para os resíduos envolvidos. De modo geral, toda molécula com resultado abaixo de -5.0 é considerada errada; entre -5.0 e -3.0 o enovelamento é considerado inadequado e pobremente refinado; entre -3.0 e 0 a molécula é considerada boa; entre 0 e 2.0 o modelo é bom; acima de 2.0 ele é considerado estranho, ou uma perfeita hélice.

O programa PROCHECK analisa tanto a geometria global da estrutura quanto a de cada resíduo, utilizando parâmetros estereoquímicos derivados de estruturas de alta resolução. Os dados de entrada são arquivos contendo coordenadas 3D (no formato .pdb) e a resolução dessas estruturas. Inicialmente o arquivo da estrutura passa por um processo de “limpeza”, visando corrigir a nomenclatura dos átomos em desacordo com a IUPAC.

Outros parâmetros analisados são: geometria covalente (distâncias e ângulos de ligação da cadeia principal), planaridade (de anéis aromáticos: Phe, Tyr, Trp, His; e de grupos terminais: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, por meio de RMS, “**Root Mean Square**” ou raiz quadrada média), ângulos diédricos (distribuição phi-psi dos resíduos em regiões específicas do diagrama de Ramachandran: “core” ou centro, “allowed” ou permitida, “generous allowed” ou generosamente permitida e “disallowed” ou não permitida. Também avalia a distribuição dos resíduos quanto a chi1-chi2, ângulos torsionais chi1, ângulos torsionais chi3 e chi4 para os que possuem, e ângulos torsionais ômega. Como referência, são utilizados fatores G – log de chances – obtidos empiricamente), quiralidade (verificação do ângulo torsional zeta, definido pelos planos dos átomos C α -N-C e N-C-C β), interações não covalentes (busca por maus contatos, definidos por átomos não ligados com distâncias menores que 2.6 Å, sendo previamente descartadas possíveis ligações de pontes de hidrogênio), pontes de hidrogênio da cadeia principal (a verificação é realizada com base nas energias de ligações de hidrogênio na cadeia principal), pontes dissulfeto (as distâncias de

ligações S-S são comparadas com a ideal, 2.0 Å, e o ângulo torsional χ^3 aos valores ideais -85.8 graus (conformação de mão esquerda) e 96.8 graus (conformação de mão direita), parâmetros estereoquímicos e análise resíduo por resíduo (visão geral da normalidade de cada resíduo na estrutura, inclusive quando ele possui características atípicas).

Assim que uma região problemática era detectada, realizavam-se alterações rotacionais ou minimizações energéticas locais para melhorar a qualidade do modelo, por meio do programa Swiss PDB-Viewer v3.7 (Guex & Peitsch, 1996).

RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA

A análise filogenética, usando o programa Phylip Package (Felsenstein, 1989), foi aplicada numa tentativa de agrupar diversas serinopeptidases, a maioria delas de peçonhas ofídicas, de acordo com sua relação evolutiva. Inicialmente o alinhamento global de todas as serinopeptidases, realizado com o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), foi aplicado no programa Gblocks 0.91b (Castresana, 2000) para a remoção das posições pobremente alinhadas (ricas em inserções ou em intervalos, também conhecidos como “gaps”) e melhorar a análise filogenética.

O alinhamento foi levado ao Paup (Swofford *et al.*, 2001) para avaliação do sinal filogenético (verificação da proporção entre os efeitos gerados pelo acaso, chamados de “ruído de fundo”, com o observado, intitulado de “sinal”) e da porcentagem de caracteres indicativos de parcimônia (relação entre o número de posições úteis na reconstrução filogenética e o número total de posições).

Os dados passaram então pelo Seqboot para a geração de réplicas por permutação das seqüências moleculares e definição de sua ordem de entrada na análise, que costuma interferir no resultado final. Tais replicações foram aplicadas em dois métodos distintos de reconstrução filogenética.

No primeiro método, baseado na parcimônia, as replicações foram inseridas no Protpars (Parcimônia Comum, *Geração numérica aleatória* ou “Random number seed” = 4533 e *Embaralhamento das seqüências* ou “Jumble” = 1). Este programa

procura pela árvore construída a partir do menor número de mutações, ou seja, que apresente os menores ramos para a representação evolutiva das seqüências.

No segundo método, as réplicas serviram como dados de entrada no Protdist, um programa que determina a distância existente entre pares de seqüências com base numa tabela de substituições de aminoácidos. A matriz de distância resultante, baseada na matriz de Dayhoff PAM, foi levada ao Kitsch (*Geração numérica aleatória* ou “*Random number seed*” = 4533 e *Embaralhamento das seqüências* ou “*Jumble*” = 3). O algoritmo Kitsch assume que todas as seqüências são contemporâneas e que existe um relógio evolucionário, o qual determina uma taxa constante de mutações para as seqüências analisadas.

Os resultados das análises pelos métodos da parcimônia e da distância entre as seqüências foram inseridos no Consense com o objetivo de selecionar a árvore filogenética mais adequada a partir da porcentagem definida para cada seqüência incluída na árvore. Todas as figuras referentes às árvores foram construídas pelo programa Drawgram.

