#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

#### FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos bioquímicos e estruturais de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pirajai* 

**Carolina Petri Bernardes** 

Ribeirão Preto 2012

#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

#### FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

### Estudos bioquímicos e estruturais de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pirajai*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Carolina Petri Bernardes Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Ribeirão Preto 2012 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Bernardes, Carolina Petri

Estudos bioquímicos e estruturais de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pirajai*. Ribeirão Preto, 2012.

127 p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Vilela, Suely.

1. Peçonhas de serpentes. 2. *Bothrops pirajai*. 3. Enzimas proteolíticas. 4. Metaloprotease. 5. Membrana Basal. 6. Hemorragia. 7. Hemostasia. 8. Inflamação. 9. Proteoma.

Foto da capa de autoria de Carolina Petri Bernardes

#### FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Carolina Petri Bernardes

Título do trabalho: Estudos bioquímicos e estruturais de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pirajai*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Aprovado em:

#### Banca Examinadora

Prof. Dr.		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.		
Instituição:	Assinatura:	

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado!

Aos meus pais, Raquel e Mario, pelo carinho, confiança, apoio e dedicação. Faltam-me palavras para descrever o quanto sou grata. Amo vocês!

Ao meu querido irmão Lucas, meu grande amigo e exemplo. Obrigada pelos conselhos, carinho e amizade. Amo você!

### AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos amigos: Dan, Renata, Sil, Norival, Lucas, Johara, Tássia e Clayton: foi um longo caminho, com bons e maus momentos, que percorremos juntos. Agradeço pelas viagens, auxílio em experimentos, jogos de vôlei e principalmente pela amizade. Obrigada por tudo!

Um agradecimento especial ao Dan, meu querido companheiro de cromatografias, peçonha, experimentos, projeto, cinema, músicas, opiniões e até a data de nascimento. Foi um grande prazer partilhar todos esses momentos com você!

Às minhas amigas de Uberlândia, Cris, Lara e Fernanda Agostinho: sempre com muito carinho, me apoiaram e me deram força para seguir em frente. Mesmo a distância, a amizade de vocês foi muito importante para mim!

À Prof. Dra. Suely Vilela por me receber em seu laboratório e permitir a finalização do meu doutorado. Obrigada pela oportunidade e pelo voto de confiança.

Aos professores Dra. Tereza Escalante, Dr. José Maria Gutiérrez e Dr. Bruno Lomonte: o tempo que passei ao lado de vocês foi muito especial e de grande aprendizado pessoal e profissional. Agradeço de coração a oportunidade!

A Cris Bregge e ao Aaron: agradeço de coração por me receberem e pela companhia em um momento tão importante para mim!

As minhas queridas amigas da Costa Rica Erika e Daniela: obrigada pela paciência, pela ajuda nos experimentos e pelos ótimos momentos que passamos. Espero que no futuro possamos trabalhar juntas novamente! Aos amigos do SV1: Cassio, Tati, Renato e Marco Aurélio. Obrigada pelas conversas descontraídas e pelos cafés. À Lanuze e Raquel que estão seguindo novos caminhos, obrigada pelo bate-papo, companhia e conselhos!

Aos técnicos Adélia, Vanessa, Luiz, Sante e Franco: obrigada pela ajuda nos experimentos. A ajuda de vocês foi essencial para a conclusão deste projeto.

Às alunas Denise (FCFRP) e Carla (UFU) pela ajuda nos experimentos e análise dos resultados.

Aos professores que colaboraram direta ou indiretamente deste trabalho, auxiliando na análise dos resultados e na disponibilização dos laboratórios.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Andreimar Soares, pela oportunidade, pelos ensinamentos e orientação que permitiram a realização deste projeto.

À FAPESP pela bolsa de estudos fornecida, pelo apoio financeiro que permitiu que eu participasse de congressos e eventos científicos, possibilitando grande crescimento profissional e pessoal.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, à Universidade de São Paulo como um todo e a todos os seus funcionários.

#### RESUMO

BERNARDES, C.P. Estudos bioquímicos e estruturais de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pirajai*. 2012. 127 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

As peçonhas de serpentes são misturas complexas de moléculas bioativas resultando em um produto biológico eficiente que tem como principais objetivos a promoção de imobilização, morte e digestão inicial de presas. As metaloproteases e as serinoproteases estão entre as principais enzimas responsáveis por afetar o sistema hemostático por diferentes mecanismos. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização bioquímica, funcional e estrutural de uma metaloprotease da classe P-I a partir da peçonha de Bothrops pirajai. A metaloprotease foi isolada utilizando três passos cromatográficos: exclusão molecular em Sephacryl S-200, troca iônica em CM-Sepharose e afinidade em Blue Sepharose, resultando na metaloprotease denominada BpirMP. A massa molecular da enzima foi determinada por espectrometria de massas (23,15 kDa), e conforme visualizado por SDS-PAGE, a molécula apresentou cadeia polipeptídica única. A determinação da sequência parcial de aminoácidos e o alinhamento múltiplo com sequências depositadas em bancos de dados mostrou alta identidade (70-90%) com outras metaloproteases da classe P-I de peconhas de serpentes. A molécula possui a sequência de consenso HELGHNLGMEH, bem como a sequência de CVM, que caracterizam a superfamília das metaloproteases "metzincinas". A enzima mostrou ação sobre o fibrinogênio, degradando as cadeias Aa e BB, sendo capaz também de degradar coágulos de fibrina e de sangue *in vitro*, dissolvendo completamente o coágulo de sangue na maior dose testada. A enzima não apresentou atividade coagulante sobre plasma sanguíneo. A atividade proteolítica da metaloprotease sobre a azocaseína foi avaliada em diferentes condições de pH e temperatura, mostrando que a enzima tem a sua atividade reduzida em pHs ácidos e em temperaturas superiores a 60 °C. A atividade proteolítica foi inibida por agentes quelantes como EDTA, EGTA e 1,10fenantrolina e por agentes redutores como β-mercaptoetanol e DTT. Inibidores específicos de serinoproteases (benzamidina, leupeptina e aprotinina) não apresentaram efeito sobre a atividade proteolítica da BpirMP. A enzima mostrou-se hemorrágica, apresentando dose hemorrágica mínima (DHM) de 50 µg. BpirMP hidrolisou componentes da membrana basal tanto *in vitro* como *in vivo*, degradando preferencialmente laminina e nidogênio. A metaloprotease apresentou efeitos sobre processos inflamatórios como a indução de edema e dor, promovendo um pronunciado recrutamento de neutrófilos e aumento significativo na quantidade total de leucócitos no exsudato inflamatório. A avaliação da participação de diferentes mediadores inflamatórios na indução do edema e hiperalgesia indicaram o envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico e histamina. O efeito citotóxico induzido pela metaloprotease foi avaliado sobre o músculo gastrocnêmico de camundongos e também nos tecidos cardíaco, renal, pulmonar e esplênico, apresentando degeneração das fibras musculares e infiltrado leucocitário. Os resultados demonstram que a BpirMP é uma metaloprotease de baixa massa molecular, com baixa atividade hemorrágica, pertencente à classe P-I, descrita pela primeira vez para a espécie B. pirajai. A caracterização da peçonha de Bothrops pirajai foi realizada por meio de técnicas proteômicas para determinar a sua composição proteica. As proteínas foram separadas por RP-HPLC, seguido por SDS-PAGE, digestão tríptica "in-gel" e identificação por espectrometria de massa por MALDI-TOF/TOF, e atribuição de famílias de proteínas conhecidas por homologia. Proteínas pertencentes a sete famílias foram encontradas na peçonha de B. pirajai, incluindo grande abundância de fosfolipases  $A_2$  (~40%) e metaloproteases (~20%).

**Palavras-chave**: *Bothrops pirajai*. Enzimas proteolíticas. Metaloprotease. Membrana Basal. Hemorragia. Hemostasia. Inflamação. Proteoma.

#### ABSTRACT

BERNARDES, C.P. Structural and biochemical studies on a metalloproteinase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. 2012. 127 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Ssnake venoms are complex mixtures of bioactive molecules resulting in an efficient biological product with the purpose of promoting immobilization, death and initial digestion of prey. Metalloproteinases and serine proteases are among the major enzymes responsible for affecting the hemostatic system by different mechanisms. The present study aimed at the isolation and biochemical and structural characterization of a P-I class metalloproteinase from Bothrops pirajai snake venom. This enzyme was isolated using three chromatographic steps: molecular exclusion on Sephacryl S-200, ion exchange on CM-Sepharose and affinity on Blue Sepharose, resulting in a metalloproteinase called BpirMP. Its molecular mass was determined by mass spectrometry (23.15 kDa), and as visualized by SDS-PAGE, the molecule showed a single polypeptide chain. The determination of the partial amino acid sequence and multiple alignment with sequences deposited in databases showed high identity (~90%) with other P-I class metalloproteinases from snake venoms. BpirMP has the consensus sequence HELGHNLGMEH and the VCM sequence, which characterize the superfamily of metzincins metalloproteinases. The enzyme showed activity on fibrinogen, degrading Aa and BB chains, and was also able to degrade fibrin and blood clots in vitro, completely dissolving the blood clot at the highest dose tested. The enzyme was unable to coagulate blood plasma. The proteolytic activity of the metalloproteinase on azocasein was evaluated under different conditions of pH and temperature, showing that BpirMP has its activity reduced in acidic pHs and temperatures above 60 °C. The proteolytic activity was inhibited by chelating agents such as EDTA, EGTA, and 1,10phenanthroline and by reducing agents as β-mercaptoethanol and DTT. Specific inhibitors of serine proteases (benzamidine, leupeptin and aprotinin) had no effect on the proteolytic activity of BpirMP. The enzyme induced hemorrhage, presenting a minimal hemorrhagic dose (MHD) of 50 µg. BpirMP hydrolyzed basement membrane components both in vitro and in vivo, preferably degrading laminin and nidogen. The metalloproteinase showed effects on inflammatory processes such as induction of pain and edema, promoting a pronounced neutrophil recruitment and significant increase in the total number of leukocytes in inflammatory exudate. The evaluation of the contribution of different inflammatory mediators in the induced edema and hyperalgesia indicated the involvement of arachidonic acid metabolites and histamine. The cytotoxic effect induced by BpirMP was evaluated on the gastrocnemius muscle of mice and heart, kidney, lung and spleen tissues, showing degeneration of muscle fibers and leukocyte infiltration. The results demonstrate that BpirMP is a low molecular mass and low hemorrhagic metalloproteinase belonging to the P-I class, described for the B. pirajai species for the first time. The characterization of Bothrops pirajai venom was performed using proteomic techniques to determine its composition. Proteins were separated by RP-HPLC, followed by SDS-PAGE, tryptic in-gel digestion and identification by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry, assigning family classification by homology to known proteins. Seven protein families were found in the venom of *B. pirajai*, with an abundance of phospholipases  $A_2$  (~40%) and metalloproteinases (~20%).

**Keywords:** *Bothrops pirajai.* Proteolytic enzymes. Metalloproteinase. Basement Membrane. Hemorrhage. Hemostasis. Inflammation. Proteome.

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação esquemática das metaloproteases de peçonhas de serpentes
(SVMPs) proposta por Fox e Serrano (2008)7
Figura 2. Geração de metabólitos do ácido araquidônico e sua influência na inflamação 12
Figura 3. Foto da serpente <i>Bothrops pirajai</i> 16
Figura 4. Purificação da metaloprotease da peçonha de <i>Bothrops pirajai</i>
Figura 5. Análise do grau de pureza da metaloprotease isolada da peçonha de <i>Bothrops</i> <i>pirajai</i>
Figura 6. SDS-PAGE a 12% da metaloprotease isolada de <i>Bothrops pirajai</i>
Figura 7. Espectrometria de massas da metaloprotease BpirMP isolada da peçonha de <i>B</i> . <i>piraja</i> 41
Figura 8. Atividade proteolítica da metaloprotease de <i>B. pirajai</i> sobre a azocaseína
Figura 9. Atividade proteolítica da metaloprotease de <i>B. pirajai</i> sobre o azocolágeno43
Figura 10. Influência do pH e temperatura na atividade proteolítica da metaloprotease de         B. pirajai sobre a azocaseína.       44
<b>Figura 11.</b> Influência de inibidores na atividade proteolítica da metaloprotease de <i>B</i> . <i>pirajai</i> sobre a azocaseína
Figura 12. Atividade fibrinogenolítica da metaloprotease BpirMP isolada da peçonha de <i>B. pirajai</i>
Figura 13. Atividade fibrinolítica e trombolítica <i>in vitro</i> da metaloprotease de <i>B. pirajai</i> 46
Figura 14. Atividade proteolítica da metaloprotease sobre componentes da membrana basal47
Figura 15. Atividade proteolítica sobre matrigel
Figura 16. Hidrólise dos componentes da membrana basal in vitro pelas metaloproteases         BpirMP e BaP1       49
Figura 17. Hidrólise dos componentes da membrana basal <i>in vitro</i> pela metaloprotease BpirMP isolada de <i>Bothrops pirajai</i> analisados por Western Blot
Figura 18. Análise por Western Blot da hidrólise do Matrigel pelas metaloproteases BpirMP e BaP1

Figura 19. Hidrólise de componentes da membrana basal <i>in vivo</i> pelas metaloproteases         BpirMP e BaP1       56
<b>Figura 20.</b> Análise histopatológica após injeção da metaloprotease BpirMP isolada da peçonha de <i>B. pirajai</i>
<b>Figura 21</b> . Análise histopatológica após injeção da metaloprotease BpirMP isolada da peçonha de <i>B. pirajai</i>
<b>Figura 22</b> . Atividade miotóxica da metaloprotease BpirMP isolada da peçonha de <i>B</i> . <i>pirajai</i>
<ul> <li>Figura 23. Atividade hemorrágica da metaloprotease BpirMP isolada de <i>B. pirajai</i>61</li> <li>Figura 24. Avaliação dose tempo-resposta do edema induzido pela metaloprotease</li> <li>BpirMP</li></ul>
Figura 25. Avaliação dos mediadores envolvidos na resposta edematogênica induzida         pela toxina BpirMP
Figura 26. Avaliação dose tempo-resposta da hiperalgesia induzida pela metaloprotease BpirMP
<b>Figura 27</b> . Avaliação dos mediadores inflamatórios envolvidos na hiperalgesia induzida pela metaloprotease BpirMP
<b>Figura 28.</b> Contagem total dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após 6 e 24 horas da administração da metaloprotease de <i>B. pirajai</i>
<b>Figura 29.</b> Contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após 6 e 24 horas da administração da metaloprotease de <i>B. pirajai</i>
Figura 30. Sequência parcial de aminoácidos da metaloprotease BpirMP
<b>Figura 31.</b> Alinhamento múltiplo da sequência parcial de aminoácidos da metaloprotease BpirMP com sequências de outras metaloproteases da classe P-I de peçonhas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>
<b>Figura 32.</b> Representação em cartoon do modelo teórico da metaloprotease BnirMP 73
<b>Figura 33.</b> Representação em cartoon das pontes dissulfeto da estrutura da metaloprotease BpirMP

Figura 34. Coordenação do cofator $Zn^{2+}$ (esfera verde) do sítio catalítico d	a
metaloprotease BpirMP	74
Figura 35. Análise do modelo estrutural da metaloprotease BpirMP.	75
Figura 36. Fracionamento da peçonha bruta de <i>B. pirajai</i> em RP-HPLC	76
Figura 37. SDS-PAGE das frações resultantes do fracionamento da peçonha de B. piraja	ıi
em RP-HPLC	77
Figura 38. Resumos das composições de proteínas da peçonha de Bothrops pirajai	77

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metaloproteases isoladas de peçonhas de serpentes	6
Tabela 2. Identificação dos produtos de degradação do matrigel pela metaloprotease	
BpirMP	0
Tabela 3. Perfil das frações isoladas por RP-HPLC da peçonha de Bothrops pirajai e	
identificação das famílias de proteínas por MALDI-TOF-TOF7	'8

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
DHM	Dose Hemorrágica Mínima
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IL	Interleucina
LAAO	L- aminoácido oxidase
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo
MB	Membrana Basal
MEC	Matriz extracelular
MS	Espectrometria de massas
NDGA	Ácido nordiidroguaiarético
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Salina tamponada com fosfato
PG	Prostaglandina
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
RIPA	Tampão Tris-HCL 25mM, NaCl 150mM, Triton x-100 1%, SDS 1%, EDTA 20mM
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

SVMPs	Metaloproteases	de peçonhas	de serpentes
-------	-----------------	-------------	--------------

**SVSPs** Serinoproteases de peçonhas de serpente

TBS Tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,14M pH 7,6

- TCA Ácido tricloroacético
- **TEMED** Tetrametiletilenodiamina
- **TFA** Ácido trifluoroacético
- **TNF-** $\alpha$  Fator de necrose tumoral  $\alpha$
- TX Tromboxano
- WB Western Blot

Resum	0	i
Abstra	ct	.ii
Lista d	e Figuras	iii
Lista d	e tabelas	vi
Lista d	e abreviaturas e siglas	vii
		-
1. IN	TRODUÇAO	2
1.1. Q	Quadro clínico e epidemiologia dos acidentes ofídicos	2
1.2. P	eçonhas de serpentes	.4
1.3. N	Ietaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs)	5
1.4. S	VMPs, Matriz Extracelular e Hemostasia	. 8
1.5. S	VMPs e a resposta inflamatória	11
1.6. S	VMPs: potencial terapêutico e aplicações	13
1.7. P	roteômica de peçonhas de serpentes	15
2. Ol	BJETIVOS	18
2.1. 0	Objetivos gerais	18
2.2. 0	bjetivos específicos	18
3. M	ATERIAIS e MÉTODOS	21
3.1. N	Iateriais	21
3.1.1.	Animais	21
3.1.2.	Peçonha	21
3.1.3.	Plasma humano	21
3.1.4.	Medicamentos	21
3.1.5.	Matrigel	22
3.1.6.	Toxinas	22
3.1.7.	Demais Reagentes e Materiais	22
3.2. Is	solamento da metaloprotease de <i>Bothrops pirajai</i>	22
3.2.1.	Cromatografia de exclusão molecular em Sepharyl S-200	22
3.2.2.	Cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose	22
3.2.3.	Cromatografia de afinidade em Blue-Sepharose	23
3.2.4.	HPLC de fase reversa	23
3.3. C	aracterização bioquímica	23

#### SUMÁRIO

3.3.1.	Determinação quantitativa de proteínas	. 23
3.3.2.	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio	ı
(SDS-	-PAGE)	. 24
3.3.3.	Determinação da massa molecular	. 24
3.4.	Caracterização enzimática	25
3.4.1.	Atividade proteolítica sobre azocaseína	. 25
3.4.2.	Atividade proteolítica sobre azocolágeno	. 25
3.4.3.	Atividade proteolítica sobre fibrinogênio	. 26
3.4.4.	Atividade proteolítica sobre fibrina	. 26
3.4.5.	Atividade trombolítica	. 27
3.4.6.	Atividade proteolítica sobre componentes da membrana basal in vitro	. 27
3.4.7.	Degradação de componentes da membrana basal in vivo	. 29
3.5.	Caracterização funcional	. 29
3.5.1.	Atividade hemorrágica	. 29
3.5.2.	Atividade coagulante	. 30
3.5.3.	Atividade miotóxica	. 30
3.5.4.	Análise histopatológica	. 30
3.5.5.	Atividade edematogênica	. 31
3.5.6.	Avaliação da hiperalgesia	. 31
3.5.7.	Mediadores inflamatórios	. 32
3.5.8.	Análise do exsudato inflamatório peritoneal	. 33
3.6.	Caracterização estrutural	33
3.6.1.	Determinação da estrutura primária da BpirMP	. 33
3.6.2.	Alinhamento múltiplo	. 34
3.6.3.	Modelagem teórica da metaloprotease	. 34
3.7.	Análise proteômica da peçonha bruta de <i>B. pirajai</i>	
3.7.1.	Fracionamento da peçonha bruta por RP-HPLC	. 34
3.7.2.	Caracterização das frações obtidas por RP-HPLC	. 35
3.8.	Análise estatística	36
4. ]	RESULTADOS	
4.1.	Isolamento da metaloprotease BpirMP	. 38
4.2.	Determinação da massa molecular	. 40
4.3.	Caracterização da metaloprotease BpirMP	. 42
4.3.1.	Atividade proteolítica sobre azocaseína e azocolágeno	. 42

4.3.2	P. Atividade fibrinogenolítica	45
4.3.3	8. Atividade fibrinolítica e trombolítica	45
4.3.4	Atividade coagulante sobre o plasma	46
4.3.5	Atividade proteolítica sobre componentes da membrana basal in vitro	46
4.3.6	5. Atividade proteolítica sobre componentes da membrana basal in vivo	55
4.3.7	7. Análise histopatológica	56
4.3.8	8. Atividade miotóxica	60
4.3.9	). Atividade hemorrágica	60
4.3.1	0. Efeitos pró-inflamatórios	61
4.4.	Caracterização estrutural	69
4.4.1	. Determinação da estrutura primária da metaloprotease	69
4.4.2	2. Alinhamento múltiplo	
4.4.3	8. Modelagem teórica da BpirMP	72
4.5.	Análise proteômica da peçonha de <i>Bothrops pirajai</i>	76
5.	DISCUSSÃO	
6.	CONCLUSÕES	109
7.	REFERÊNCIAS	

# INTRODUÇÃO

#### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Quadro clínico e epidemiologia dos acidentes ofídicos

As serpentes compõem um dos grupos mais bem sucedidos dos vertebrados, exibindo grande riqueza de espécies e habitando uma enorme variedade de ambientes (LEE; SCANLON, 2002). Estima-se que no mundo existam aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, classificadas em quatro famílias Elapidae, Hydrophiidae, Viperidae e Colubridae. No Brasil as espécies de serpentes peçonhentas pertencem às famílias Elapidae e Viperidae (CARDOSO, 2003). Na família Viperidae, destaca-se a subfamília Crotalinae, à qual pertencem os gêneros *Crotalus* (cascavéis), *Bothrops* (jararacas) e *Lachesis* (surucucus) e a família Elapidae, que engloba o gênero *Micrurus* (corais verdadeiras) (MELGAREJO, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no mundo, ocorrem em média 1.665.000 acidentes por ano, envolvendo serpentes peçonhentas, com 30.000 a 40.000 mortes. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, em 2010 ocorreram aproximadamente 30.000 mil acidentes ofídicos, sendo a maioria destes acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, sendo raros os causados por *Lachesis* e *Micrurus* (MINISTERIO DA SAÚDE, 2012). A incidência real de envenenamento por picadas de serpentes em todo o mundo e a mortalidade associada são difíceis de estimar, já que há muitos países onde esta doença não é adequadamente relatada e os dados epidemiológicos são fragmentados. No entanto, um estudo publicado em 2008 estima que, pelo menos, 421.000 casos de envenenamento e 20.000 mortes ocorram anualmente, ainda que estes valores largamente baseados em hospitais possam estar subestimados, sendo superior a 1.841.000 resultando em 94.000 mortes (KASTURIRATNE et al., 2008).

Os acidentes humanos provocados por picadas de serpentes constituem um problema de saúde pública global por ser uma patologia que afeta principalmente jovens trabalhadores que vivem em áreas rurais, distante de centros médicos em regiões pobres economicamente (GUTIÉRREZ, 2012). Muitas das vítimas conseguem sobreviver ao acidente ofídico, porém com sequelas físicas permanentes, e como a maioria dos acidentes ocorre com jovens trabalhadores o impacto econômico é considerável (GUTIERREZ et al., 2007).

As serpentes do gênero *Bothrops* são as mais comuns no Brasil sendo responsáveis por mais de 80% dos acidentes peçonhentos, seguidos pelo gênero *Crotalus* (9,2%), *Lachesis* (2,7%) e em menor frequência os gêneros *Micrurus* (0,6%) (QUEIROZ et al., 2008; MINISTERIO DA SAÚDE, 2012). O gênero *Bothrops* é formado por cerca de 30 espécies distribuídas por todo o território nacional (RIBEIRO; JORGE 1997). As espécies mais comuns são: jararaca (*B. jararaca*), jararaca ilhoa (*B. insularis*), jararaca pintada (*B. neuwiedi*), cotiara (*B. fonsecai*), jararacussu (*B. jararacussu*) e caiçaca (*B. moojeni*). A classificação das serpentes é essencial para a produção de soro apropriado e eficiente no tratamento dos pacientes de acidentes ofídicos. Com o avanço dos estudos sobre o conhecimento das relações filogenéticas entre as serpentes ocorreram mudanças na classificação das serpentes das famílias Elapidae e Viperidae, no qual novas espécies foram descritas e outras revalidadas ou elevadas de categoria passando de subespécie para espécie (BERNARDE, 2011). Na classificação atual, as espécies de serpentes que pertenciam ao gênero *Bothrops* foram redistribuídas em cinco gêneros: *Bothriopsis (Bothriopsis bilineata), Bothrocophias (Bothrocophias hyoprora), Bothropoides (Bothropoides pauloensis), Bothrops (Botrops moojeni*) e *Rhinocerophis (Rhinocerophis alternatus*) (FENWICK et al., 2009). A espécie foco deste trabalho, *Bothrops pirajai*, não sofreu alterações permanecendo no gênero *Bothrops* na atual classificação.

Os sinais clínicos e a patologia decorrente dos envenenamentos ofidicos estão relacionados à composição das peçonhas e consequentemente apresenta variações tanto entre gêneros distintos, como entre as diferentes espécies que compõem um mesmo gênero. O envenenamento botrópico, por exemplo, as manifestações clínicas observadas são devido a intensa atividade proteolítica, causando vários distúrbios fisiopatológicos, incluindo transtornos sistêmicos da hemostasia relacionados com a ativação dos fatores X e II da cascata de coagulação, o consumo de fibrinogênio, inibição da agregação plaquetária (ZELANIS et al., 2007), hemorragia e lesões locais resultando em sequelas permanentes ou amputação do membro afetado (VITAL BRASIL, 1982; DU et al., 2006).

No caso do envenenamento por serpentes do gênero *Lachesis*, o quadro clínico se assemelha ao do envenenamento bothrópico, com manifestações locais devido à ação proteolítica da peçonha, distúrbios de coagulação e hemorragia, porém usualmente mais severos. A composição das peçonhas de serpentes do gênero *Micrurus* é caracterizada pelo conteúdo de neurotoxinas de baixa massa molecular, sendo absorvidas e difundidas rapidamente pelo organismo induzindo os efeitos na presa, de forma muito rápida (PINHO; PEREIRA, 2001).

No caso do acidente crotálico, a peçonha apresenta uma ação sistêmica mais acentuada causando paralisia flácida do músculo esquelético que leva a problemas respiratórios, além de uma ação coagulante e intensa atividade miotóxica sistêmica podendo evoluir para

insuficiência renal aguda, não apresentando nenhum sinal clínico local pronunciado como lesão tecidual, bolhas e edema (PINHO; PEREIRA, 2001).

#### 1.2. Peçonhas de serpentes

As peçonhas de serpentes são caracterizadas por uma mistura complexa de substâncias (LU et al., 2005) resultando em um produto biológico eficiente e complexo que tem como principais objetivos a imobilização, morte e a promoção da digestão inicial de presas (TAKEDA et al., 2011).

A composição das peçonhas de serpentes inclui compostos inorgânicos como os íons zinco e cálcio, e componentes orgânicos como aminoácidos, nucleosídeos, aminas biogênicas e proteínas que correspondem a mais de 90% da massa seca da peçonha (MATSUI et al., 2000; JUNQUEIRA DE AZEVEDO; HO, 2002). Dentre os componentes proteicos estão as L-aminoácido oxidases (LAAOs), fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) e as enzimas proteolíticas como metaloproteases e serinoproteases (CASTRO et al., 1998; FRANCO, 2003; GAY et al., 2005). Entre os componentes da peçonha também podemos encontrar hialuronidases, nucleotidases, fatores de crescimento neural (NGFs), lectinas tipo C, peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) e desintegrinas (MARKLAND 1998; RAMOS et al., 2006).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) são enzimas que atuam sobre o sistema hemostático pela ativação dos fatores de coagulação e indução de agregação plaquetária (SERRANO; MAROUN, 2005). As SVSPs também podem apresentar outras atividades biológicas como a ativação do sistema complemento, participar do processo de diferenciação celular e atuar sobre o sistema nervoso (WU et al., 2001). Isoladamente, as serinoproteases não são consideradas letais, mas contribuem para o efeito tóxico quando associadas com outras proteínas da peçonha (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

As PLA<sub>2</sub>s compreendem uma grande família de proteínas e demonstram uma considerável homologia quanto à sequência de aminoácidos (PONCE-SOTO et al., 2007a). As PLA<sub>2</sub>s catalisam a hidrólise de fosfolipídeos da membrana de células liberando precursores importantes relacionados com importantes atividades farmacológicas, tais como efeitos sobre plaquetas, neurotoxicidade, atividade anticoagulante, cardiotoxicidade, edema, miotoxicidade e inflamação (OHNO et al., 2003; GUTIERREZ; OWNBY, 2003). São encontradas em vários fluidos biológicos e também em venenos de moluscos e artrópodes.

As L-aminoácido oxidases (LAAOs, E.C. 1.4.3.2) são flavoenzimas, com efeitos tóxicos atribuídos à formação de peróxido de hidrogênio, no processo de deaminação oxidativa de substratos de L-aminoácidos (DU; CLEMETSON, 2002). São amplamente

encontradas em diferentes organismos como bactérias, fungos e algas verdes (STÁBELI et al., 2004). Suas ações tóxicas mais estudadas incluem os efeitos sobre plaquetas, indução de apoptose, ação antibacteriana e antiparasitária (DU; CLEMETSON, 2002).

As metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs) são enzimas dependentes de Zn<sup>++</sup>, capazes de degradar proteínas da membrana dos vasos, permitindo o extravasamento de sangue sendo assim as principais responsáveis pelo efeito hemorrágico característico de envenenamentos por serpentes da família Viperidae (FOX; SERRANO, 2005). Os efeitos tóxicos destas enzimas também estão relacionados à patogenia da mionecrose local e dano tecidual (GUTIÉRREZ et al., 1995a; RUCAVADO et al., 1999) e às reações inflamatórias (TEIXEIRA et al., 2005; ZYCHAR et al., 2010).

A partir deste ponto, as metaloproteases de peçonhas de serpentes serão abordadas mais especificamente, já que o foco do presente trabalho está no estudo dessa classe de enzimas.

#### **1.3.** Metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs)

SVMPs são enzimas cuja atividade catalítica é dependente de zinco (MASKOS; BODE, 2003). As SVMPs são filogeneticamente relacionadas à família de proteínas ADAM (<u>A</u> <u>D</u>esintegrin and <u>M</u>etalloproteinase) e compõem a família das Adamalysin/Reprolysin/ADAM. Adamalisinas em conjunto com outras famílias de proteínas como Serralisinas, Astacinas e Matrixinas (MMPs) compõem o clã das Metzincinas. As famílias de proteínas que compõem o clã das metzincinas compartilham atributos estruturais característicos como a sequência consenso estendida HEXXHXXGXXH e o resíduo de metionina conservado adjacente ao sítio catalítico.

Nos últimos anos, diferentes metaloproteases foram isoladas de peçonhas de serpentes, tais como: BmooMP- $\alpha$  (BERNARDES et al., 2008), BleucMP (GOMES et al., 2011), Neuwiedase (RODRIGUES et al., 2000), LHmF, Batx-1, Atroxlisina-1 (SANCHEZ et al., 2010), leucurolisina-a (BELLO et al., 2006), BaP1 (GUTIERREZ et al., 1995), jararagina (PAINE et al., 2008) e jerdonitina (CHEN et al., 2003) e caracterizadas quanto às suas atividades biológicas (Tabela 1). A maioria das SVMPs foram classificadas como hemorrágicas, devido à capacidade de induzir hemorragia na pele de animais (FOX; SERRANO, 2009), entretanto atividades fibrinogenolítica, fibrinolítica, apoptótica, ativação de protrombina, ativação de fator X e inibição da agregação plaquetária também são atribuídas a família das SVMPs (FOX; SERRANO, 2009; KAMIGUTI, 2005; JIA et al., 1996; BJARNASSON; FOX, 1994).

	SVMP	Serpente	Atividade	Referência
	Batroxase	B. atrox	Hemorrágica,	Cintra et al.; 2012
	BmooMP-a	B. moojeni	Fibrino(geno)lítica	Bernardes et al.; 2008
P-I	BjussuMP-II	B. jararacussu	Fibrino(geno)lítica	Marcussi et al.; 2007
	BaP1	B. asper	Hemorrágica, Inflamação	Gutierrez et al.; 2005
	Gramelisina - I	T. gramineus	Apoptose	Wu et al.; 2001
	Jerdonitina	T. jedonii	Inibe agregação plaquetária,	Chen et al.; 2003
Р-Ш —	Bilitoxina	A. bilineatus	Hemorrágica	Nikai et al.; 2000
	Atrolisina A	C. atrox	Hemorragia,	Fox; Bjamason 1995
Р-Ш	Jararagina	B. jararaca	Hemorrágica, inibe agregação plaquetária	Paine et al.; 2008
	Ecarin	E. carinatus	Ativação da protrombina	Nishida et al.; 1995
	VAP1	C. atrox	Apoptose	Masuda et al.; 1998
	RVV-X	D. russelli	Ativação do fator X	Takeya et al.; 1992
	Carinactivase	E. carinatus	Ativador de protrombina	Yamada et al.; 1996

**Tabela-1. Metaloproteases isoladas de peçonhas de serpentes** (Adaptado de: Takeda; Takeya; Iwanaga, 2012).

As metaloproteases da classe P-III são consideradas mais hemorrágicas que as metaloproteases da classe P-I (ESCALANTE et al., 2006) provavelmente (i) pela presença dos domínios adicionais, (ii) por um arranjo estrutural que facilita o acesso a alvos mais relevantes e (iii) por serem capazes de inibir a agregação plaquetária potencializando o efeito hemorrágico (KANG et al., 2011; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

Em 2005, Fox e Serrano propuseram a classificação das SVMPs em quatro diferentes grupos baseada na organização dos domínios estruturais: classe P-I de baixa massa molecular, apresentando apenas o domínio metaloprotease (M); classe P-II metaloproteases que apresentam o domínio metaloprotease (M) e o domínio desintegrina (D); classe P-III de metaloproteases de alta massa molecular contendo o domínio semelhante à desintegrina (D), o domínio rico em cisteína (C) além do domínio metaloprotease (M); e a classe P-IV, cujas SVMPs possuem o domínio lectina do tipo C, ligado por pontes dissulfeto além dos domínios presentes nas proteases da classe P-III (FOX; SERRANO, 2005).

Uma nova classificação foi proposta em 2008 por Fox e Serrano (Fig. 1), baseada nas características dos precursores das metaloproteases, bem como nos produtos gerados após processamento e modificação pós-traducional durante o processo de síntese. As classes P-II e

P-III foram divididas em subclasses baseado nas distintas modificações pós-traducionais, como a homodimerização (P-IIc e P-IIIc) ou a proteólise entre os domínios metaloprotease M e desintegrina D (P - IIb) (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2011), e a classe P-IV foi reclassificada como uma subclasse da classe P-III (P-IIId) uma vez que nenhum precursor específico contendo todos os domínios presentes na classe P-IV (domínios catalíticos, tipo desintegrina, rico em cisteína e tipo-lectina) foi descrito, indicando que essas proteases que apresentam essa estrutura são geradas por modificações pós-traducionais da estrutura P-III (FOX; SERRANO, 2008).



Figura 1. Classificação esquemática das metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs) proposta por Fox e Serrano (2008). Cada domínio está representado por uma cor diferente. M: domínio metaloprotease; D: domínio desintegrina; C: domínio rico em cisteína; CLP: lectina do tipo C (C-type lectin-like). As classes P-II e P-III estão subdivididas em subclasses baseadas em suas modificações pós-traducionais.

Estudos avaliando a capacidade de metaloproteases da classe P-I em induzir hemorragia demonstraram uma variação no potencial hemorrágico dentro da classe. A comparação entre estruturas de metaloproteases da classe P-I consideradas hemorrágicas e não hemorrágicas demonstraram pequenas variações em regiões de loops sugerindo que a variação do potencial hemorrágico possa ser explicada por tais variações (LINGOTT et al., 2009).

Atualmente, nove estruturas cristalográficas de metaloproteases da classe P-I e sete da classe P-III estão disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank*. As SVMPs da classe P-I compartilham uma estrutura terciária topologicamente equivalente de forma que podem ser sobrepostas, constituída por cinco  $\alpha$  hélices e cinco folhas  $\beta$  apresentando diferenças nas regiões dos loops que conectam as estruturas secundárias (KANG et al., 2011; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

A estrutura do domínio metaloprotease é dividida em dois subdomínios: (i) subdomínio superior constituído de cinco folhas  $\beta$  e quatro  $\alpha$  hélices e (ii) subdomínio inferior relativo à porção C-terminal da molécula e formado por loops e uma  $\alpha$  hélice. Os dois subdomínios são separados por uma fenda de ligação do substrato (RAMOS; SELISTRE DE ARAUJO, 2004; LINGOTT et al., 2009).

#### 1.4. SVMPs, Matriz Extracelular e Hemostasia

A matriz extracelular (MEC) é formada por um polímero de fibras (colágeno e elastina) incorporado em uma mistura amorfa de componentes não fibrosos (proteoglicanas) fornecendo suporte mecânico às células e funcionando como uma barreira bioquímica (TANZER, 1985; 2006). A MEC é secretada localmente preenchendo o espaço intercelular e a proporção dos componentes fibrosos e não fibrosos determinam suas características físicas e funcionais em particular dependendo do local e tecido que ela circunda (TANZER, 2006; SUKI; BATES 2008).

A membrana basal (MB) é uma estrutura especializada da matriz extracelular e é encontrada envolvendo a maioria dos tecidos e órgãos do organismo. A membrana basal desempenha papéis fundamentais na diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração de células durante o desenvolvimento embrionário, mas também atua como barreira seletiva e suporte para o tecido (SCHWARZBAUER, 1999). A sua composição, juntamente com o repertório de receptores de matriz define a especificidade das reações celulares (PÖSCHL et al., 2003).

A MB é basicamente formada por laminina e colágeno tipo IV, que são os componentes majoritários, além de fibronectina, perlecan e nidogênio (YURCHENCO; AMENTA; PATTON, 2004; TANZER, 2005). A principal característica da membrana basal é a sua estrutura básica formada por uma rede de colágeno tipo IV na qual glicoproteínas como

laminina se aderem e promovem a interação com as células contidas na matriz (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

A laminina é uma glicoproteína, com mais de 15 isoformas descritas, formada pela combinação de três cadeias polipeptídicas diferentes: 5 cadeias  $\alpha$  ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 5), 3  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 3) e 3  $\gamma$  ( $\gamma$ 1- $\gamma$ 3) (MINER; YURCHENCO, 2004). A laminina - 1 foi a primeira a ser identificada, e é uma molécula formada pelas cadeias  $\alpha$  (400 kDa),  $\beta$ 1 (300 kDa) e  $\gamma$ 1 (250 kDa) intercruzadas em que a polimerização age como um suporte para o recrutamento dos outros componentes que formaram a MB (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; SASAKI; FÄSSLER; HOHENESTER, 2004).

A fibronectina é uma glicoproteína de alta massa molecular constituída de duas cadeias unidas por uma ligação dissulfeto. Cada cadeia é formada por módulos funcionais que se ligam a integrinas, colágeno, heparina e fibrina (MATSUDA; YAMANAKA; MATSUDA, 1982; PETERSEN et al., 1983). A fibronectina está presente no plasma nas formas solúvel, que ao se ligar à fibrina forma uma matriz provisória que será responsável pela adesão celular e migração durante o processo de cicatrização de feridas, e polimérica atuando na manutenção da hemostasia (ASTROF; HYNES 2009). Além disso, a fibronectina é capaz de se ligar a sítios na fibrina que não são acessíveis no fibrinogênio (MAKOGONENKO, 2002).

O colágeno é a molécula responsável por garantir a estabilidade estrutural da MB e consequentemente dar suporte ao tecido. Até o momento mais de 20 tipos diferentes de colágenos foram descritos. Em tecidos cuja função é resistir às tensões como tendões, pele e ossos, o colágeno (tipo I, II, III, V e XI) se organiza formando fibrilas conferindo resistência a esses tecidos. Outras variações de colágeno como o tipo IV se organizam formando redes que atuam dando suporte e integridade ao tecido. O colágeno IV é o componente estrutural mais abundante na MB (BOSMAN; STAMENKOVIC 2003).

Nidogênio -1 ou entactina é uma proteína de aproximadamente 150 kDa, com três domínios globulares (G1, G2 e G3) conectados por segmentos em forma de haste (FOX et al.; 1991). Tais proteínas são responsáveis por mediar à formação de complexos entre laminina e colágeno IV *in vitro* (FOX et al., 1991; KOHFELDT et al., 1998). Entretanto o seu significado *in vivo* ainda não está completamente definido (SCHYMEINSKY et al., 2002).

A hidrólise de componentes da membrana basal de capilares por SVMPs têm sido proposta como o mecanismo pelo qual estas enzimas induzem hemorragia (ESCALANTE et al., 2006). *In vitro*, as metaloproteases são capazes de degradar o matrigel, uma preparação formada pelas proteínas da MB, além de proteínas isoladas como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV. A maioria dessas análises é realizada observando o padrão de degradação

dessas proteínas por SDS-PAGE tanto para metaloproteases hemorrágicas como não hemorrágicas (ESCALANTE et al., 2006; RUCAVADO et al., 1995).

Estudos comparando a capacidade de hidrolisar componentes de MB de diferentes metaloproteases demonstraram que diferentes SVMPs atuam de maneiras diferentes sobre os componentes da MB, variando a especificidade, intensidade e o padrão de degradação afetando a estabilidade mecânica da MB em diferentes graus dependendo do efeito que esta degradação em particular exerce nas propriedades mecânicas da matriz. Escalante e colaboradores (2006) compararam a atividade proteolítica sobre componentes da MB de duas metaloproteases: a metaloprotease BaP1 da classe P-I, e a metaloprotease da classe P-III jararagina. Nestes estudos, os pesquisadores demonstraram que a BaP1 degradou preferencialmente as cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  da laminina enquanto que a Jararagina degradou preferencialmente o nidogênio (ESCALANTE et al., 2006).

Os vasos sanguíneos são formados por três camadas denominadas túnicas e sua composição varia de acordo com o tipo de vaso, mas em sua maioria é composto por colágeno, fibronectina e elastina (BOU-GHARIOS et al., 2004). Capilares e vasos sanguíneos são mais susceptíveis aos efeitos das peçonhas de serpentes, que agem alterando a permeabilidade vascular e desestabilizando as junções intercelulares permitindo o extravasamento de plasma e hemácias (BJARNASON; FOX, 1995). Vítimas de acidentes ofídicos apresentam sinais clínicos como hipoagregação e consumo intenso de fibrinogênio. Segundo Gutierrez e colaboradores (2005) o fluxo sanguíneo exercendo pressão mecânica sobre a parede dos vasos, associado à degradação dos componentes da MB, desempenham um papel importante na indução do processo hemorrágico *in vivo* (GUTIÉRREZ et al., 2005).

Para manter a integridade vascular, o organismo desenvolveu mecanismos de defesas como a formação do coágulo de fibrina no local da lesão, evitando a perda excessiva de sangue. A conversão do fibrinogênio em fibrina é um dos passos chaves na formação e estabilização do coágulo, e fundamental na regulação do sistema hemostático. A polimerização da fibrina se dá após a clivagem do fibrinogênio em dois fibrinopeptídeos pela trombina (SCHERAGA, 2004).

Sempre que um vaso sofre uma lesão, diferentes mecanismos são ativados para impedir a perda de sangue. Após uma lesão, a matriz extracelular é exposta, desencadeando o processo de formação de trombos pela ligação entre as fibras de colágeno exposto e as plaquetas circulantes. As plaquetas irão liberar potentes medidores, como ADP e tromboxano, que irão recrutar mais plaquetas para a formação do tampão plaquetário. Em uma etapa seguinte, o fibrinogênio é clivado pela trombina formando fibrina que é depositada no local da lesão fortalecendo o tampão plaquetário (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

Muitas metaloproteases de serpentes são capazes de afetar a hemostasia degradando componentes da cascata de coagulação, degradando componentes da MB ou ativando fatores específicos da cascata de coagulação (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

#### 1.5. SVMPs e a resposta inflamatória

A resposta inflamatória é um conjunto complexo de interações entre fatores solúveis e células que podem migrar para qualquer tecido em resposta a um evento traumático, infecções ou ferimentos (NATHAN, 2002). Esta resposta engloba uma sequência de eventos vasculares caracterizados pela vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular local com consequente extravasamento plasmático e efeitos celulares, com ativação de células fagocitárias residentes nos tecidos. (ROCHA; SILVA, 1978).

O reconhecimento inicial da infecção é mediado por macrófagos e mastócitos residentes no tecido, conduzindo à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo as quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas e eicosanoídes (MEDZHITOV, 2008). O principal efeito destes mediadores é de permitir a formação de um exsudato inflamatório no local, no qual proteínas plasmáticas e leucócitos (principalmente neutrófilos) que são normalmente limitados aos vasos sanguíneos migram para o local da infecção (ou lesão), através das vénulas pós-capilares. Ao atingir o tecido afetado, os neutrófilos são ativados, sejam pelo contato direto com agentes patogênicos ou através da ação de citocinas secretadas pelas células residentes. Os neutrófilos tentam combater os agentes invasores liberando os conteúdos tóxicos de seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio. O conteúdo tóxico dos grânulos são efetores potentes que não discriminam entre os agentes infecciosos e o tecido residente, de forma que danos colaterais aos tecidos circundantes são inevitáveis (BARTON, 2008).

Um processo inflamatório bem sucedido é resultado da eliminação dos agentes infecciosos seguidos por uma resolução e fase de reparação (NATHAN, 2002; BARTON, 2008), caracterizada pela diminuição de agentes pró-inflamatórios, aumento de mediadores anti-inflamatórios e subsequente remoção de fluidos e detritos celulares pelo sistema linfático (SERHAN; SAVILL, 2005). Caso alguma etapa da resposta inflamatória não seja capaz de executar a sua função ou o progresso para a próxima etapa seja bloqueado, o processo inflamatório persiste e adquire um novo padrão, desenvolvendo uma inflamação crônica, com a formação de granuloma e fibroses (NATHAN, 2002).

A liberação dos mediadores químicos originados nos tecidos lesados e nas células migratórias provocam distúrbios na membrana celular ocasionando a ativação de fosfolipases A<sub>2</sub> e liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos (**Fig. 2**) além de enzimas lisossômicas. Essas enzimas têm potente atividade citotóxica e destroem células vizinhas, liberando assim novas enzimas. O metabolismo do ácido araquidônico dá origem a inúmeras substâncias biologicamente ativas como prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), lipoxinas (LXs) e ácidos epoxieicosatetraenóicos (EETs).



**Figura 2. Geração de metabólitos do ácido araquidônico e sua influência na inflamação**. Fonte: http://www.javeriana.edu.co/

A injeção de peçonha da família Viperidae em mamíferos dispara dois processos no organismo: (i) o desenvolvimento dos efeitos tóxicos causados pelos componentes da peçonha, caracterizado por edema proeminente, infiltrado leucocitário e dor, e (ii) estímulo da resposta imune inata e adaptativa com o objetivo de neutralizar e remover os componentes da peçonha (LÉON et al., 2011).

Diversos mediadores já foram relacionados à inflamação promovida por peçonhas de serpentes, incluindo serotonina, histamina, fatores derivados do sistema complemento, citocinas e metabólitos do ácido araquidônico: ciclooxigenases e lipooxigenases (TREBIEN;

CALIXTO, 1989; CHAVES; BARBOZA; GUTIÉRREZ, 1995; FARSKY et al., 1997; ZAMUNER et al., 2001; ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002; OLIVO et al., 2007).

Clissa e colaboradores (2001) demonstraram que a metaloprotease jararagina induz a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . A IL-1 $\beta$  atua na ativação de linfócitos e adesão de leucócitos, além de regular a síntese de prostaglandinas, e o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) atua induzindo a morte celular por apoptose, proliferação celular, diferenciação, inflamação, combate a tumores e replicação viral.

Zychar e colaboradores (2010) demonstraram que a inibição de metaloproteases presentes na peçonha de *B. jararaca* previne o desenvolvimento da inflamação e dor em modelos murinos. Fernandes e colaboradores (2006) verificaram um aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  na cavidade peritoneal de camundongos induzido pela metaloprotease BaP1 isolada da peçonha de *B.asper*.

Estudos realizados demonstraram que o edema induzido pelo envenenamento por serpentes da espécie *B. jararaca* tem origem inflamatória, mediada por metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), sendo as metaloproteases responsáveis pela indução desses efeitos (TEIXEIRA et al., 2005). Fernandes e colaboradores (2006) demonstraram que a injeção da metaloprotease BaP1 na cavidade peritoneal de camundongos induziu uma reação inflamatória local caracterizada pelo acúmulo de leucócitos e liberação de citocinas inflamatórias (FERNANDES et al. 2006).

#### 1.6. SVMPs: potencial terapêutico e aplicações

As peçonhas de serpentes Viperidae e Crotalidae contêm uma grande variedade de proteínas e peptídeos que afetam o sistema hemostático. Tais proteínas induzem seus efeitos ativando ou inativando etapas do sistema hemostático, como por exemplo, as nucleotidases, que são potentes inibidores da agregação plaquetária (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

As metaloproteases têm sido descritas como ativas sobre a hemostasia, degradando fatores da coagulação ou proteínas de células endoteliais, e em outros casos, ativando fatores específicos da cascata de coagulação ou da fibrinólise. SVMPs que afetam a função hemostática provaram serem ferramentas úteis na elucidação de mecanismos fisiológicos, em diagnósticos clínicos e têm sido utilizados como agentes antitrombóticos (HUTTON; WARRELL, 1993).

Quando as metaloproteases fibrinolíticas foram primeiramente isoladas a partir de peçonhas, foi sugerida uma aplicação clínica para estas enzimas no tratamento de trombos devido à baixa susceptibilidade a inibidores de proteases presentes no soro humano. No decorrer dos anos, inúmeras SVMPs fibrinolíticas foram isoladas e caracterizadas a partir de

diferentes peçonhas de serpentes. A atividade hemorrágica das enzimas fibrin(ogen)olíticas é um fator relevante no que diz respeito à potencial utilização clínica destas enzimas, de forma que SVMPs fibrin(ogen)olíticas que exibem baixa ou nenhuma atividade hemorrágica apresentam maior potencial para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de pacientes com doenças vasculares (DEITCHER; TOOMBS, 2006; SAJEVIC et al., 2011).

Fibrolase, uma metaloprotease fibrinolítica isolada da peçonha de *Agkistrodon contortrix contortrix*, demonstrou atividade proteolítica direta sobre o fibrinogênio (DEITCHER; TOOMBS, 2006), e ao contrário do ativador de plasminogênio e da estreptoquinase que ativam plasmina para degradar coágulos de fibrina, a fibrolase atua diretamente sobre os coágulos de fibrina. O potencial clínico desta enzima está sendo explorado na sua forma recombinante, que avançou para a Fase III do ensaio clínico sob o nome alfimeprase. Os estudos *in vivo* demonstraram que a lise do coágulo pela alfimeprase é até 6 vezes mais rápida do que a lise observada com ativadores de plasminogênio (MARKLAND; SWENSON, 2012).

Outra função importante das SVMPs é a ativação de protrombina. Os ativadores de protrombina de peçonha podem ser subdivididos em quatro classes: A, B, C e D (JOSEPH; KINI, 2001; KINI, 2005). Os grupos A e B são metaloproteases, enquanto os grupos C e D são serinoproteases (KINI, 2005). Os representantes do grupo A não requerem cofatores, tais como cálcio, fosfolipídios ou outras proteínas, para a ativação de protrombina. O ativador de protrombina melhor caracterizado é ecarina, isolado da peçonha de *Echis carinatus*. A enzima é uma SVMP da classe P-III, que cliva seletivamente a ligação Arg322-Ile323 da protrombina liberando meizotrombina. A meizotrombina por autocatálise produz então trombina (MARKLAND; SWENSON, 2012). Em laboratórios, a ecarin tem sido usada para medir níveis de protrombina no plasma (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

Outra importante atividade biológica das SVMPs é a sua capacidade de coagulação do sangue por meio da ativação do Fator X (FX). De forma similar às SVMPs ativadoras de protrombina, metaloproteases conversoras do fator X, têm sido utilizadas para medir a concentração de FX no plasma e também para distinguir deficiências de fator VII e FX (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

As SVMPs parecem ser ferramentas úteis para investigar os mecanismos da coagulação sanguínea e têm sido extensivamente usadas no desenvolvimento de testes e diagnóstico. Além disso, estas enzimas parecem ser interessantes modelos moleculares para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e medicamentos (MARKLAND; SWENSON, 2012; BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

#### 1.7. Proteômica de peçonhas de serpentes

Proteômica é o estudo sistemático das propriedades de diversas proteínas paralelamente, com o objetivo de proporcionar uma descrição detalhada da estrutura, função e do controle de sistemas biológicos (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

A caracterização de peçonhas por meio de técnicas proteômicas é útil na análise de isoformas de toxinas, bem como os efeitos de regulação do gene de expressão de proteínas por meio da comparação da abundância relativa de proteínas na peçonha de diferentes indivíduos da população de uma mesma espécie (CALVETE et al., 2007). Proteomas de peconhas também podem ser empregados para a identificação de espécies independentemente da origem geográfica e características morfológicas (SERRANO et al., 2005; Furtado et al., 2006). A aplicação de técnicas proteômicas para caracterizar a grande variabilidade molecular dentro das famílias de toxina pode contribuir para uma compreensão mais profunda dos efeitos biológicos decorrentes do envenenamento, além de auxiliar na elaboração de protocolos de imunização mais eficientes, resultando em tratamentos e soros antiofídicos com maior especificidade e mais eficazes do que os sistemas convencionais (GUTIÉRREZ et al., 2009). A abordagem utilizada por diferentes pesquisadores inicia com o fracionamento da peconha bruta por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa, seguindo da caracterização inicial de cada fração proteica por combinação de técnicas de sequenciamento do N-terminal, SDS-PAGE, determinação das massas moleculares e por espectrometria de massas. As proteínas são separadas, submetidas à digestão tríptica in-gel, e os peptídeos trípticos resultantes são então analisados por MALDI-TOF/TOF, seguido por determinação da sequência de aminoácidos (FOX; SERRANO, 2008; CALVETE et al., 2007). Kohlhoff e colegas (2012) utilizaram o fracionamento por RP-HPLC seguido pela caracterização das frações por SDS-PAGE e identificação das proteínas por MALDI-TOF para realizarem o proteoma da peçonha das serpentes Bothrops atrox, B. barnetti and B. pictus (KOHLHOFF et al., 2012). De forma similar, Rey-Suárez e colaboradores (2011) reportaram o proteoma da peconha da serpente Micrurus mipartitus. Os autores iniciaram a caracterização da peçonha com o fracionamento em RP-HPLC, seguida por SDS-PAGE, digestão tríptica em gel e identificação por espectrometria de massas por MALDI ou ESI, e atribuição das famílias de proteínas conhecidas por similaridade (REY-SUÁREZ et al., 2011).

A caracterização detalhada das peçonhas de serpentes fornece um catálogo abrangente das toxinas secretadas nas peçonhas, que representam uma ferramenta biotecnológica valiosa para o estudo de processos fisiológicos (SERRANO et al., 2005; FOX; SERRANO, 2005; CALVETE et al., 2009), além de inúmeras aplicações potenciais para a pesquisa básica, diagnóstico clínico e desenvolvimento de novas ferramentas de pesquisa e drogas de potencial uso clínico (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

Até o momento, foram descritos a partir do gênero *Bothrops* os proteomas para as espécies *B. asper* (ALAPE-GIRÓN et a., 2008), *B. cotiara* e *B. fonsecai* (TAKASHIMA et al., 2008), *B. colombiensis* (CALVETE et al., 2009), *B. insularis* (VALENTE et al., 2009) e *B. jararaca* (ZELANIS et al., 2011). No presente trabalho, apresentamos a caracterização proteômica da peçonha bruta da espécie *Bothrops pirajai*.

A serpente *B. pirajai* é uma espécie noturna e terrícola de 1 m de comprimento. Habita floresta ombrófila densa, em altitudes de até 600 m. Sua área de ocorrência abrange a zona cacaueira do sudeste da Bahia (MACHADO et al., 2008) e nordeste de Minas Gerais (HOGE; ROMANO, 1979). Essa espécie foi descrita por Amaral (1926) e sua espécie mais próxima filogeneticamente é a *B. jararacussu*.



Figura 3. Foto da serpente Bothrops pirajai.

Fonte: http://www.arkive.org/pirajas-lancehead/bothrops-pirajai/

Atualmente, a espécie *Bothrops pirajai* se encontra na "Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção" na categoria em perigo (EN) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008) e na lista da "União Internacional para Conservação da Natureza" (IUCN, The International Union for Conservation of Nature) na categoria vulnerável (VU) (ARGOLO, 2000). A principal ameaça à espécie é a perda ou redução de seu hábitat, que se encontra em uma região de intensa exploração agrícola.
# **OBJETIVOS**

# 2. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivos gerais

• Isolamento e caracterização bioquímica e estrutural de uma metaloprotease da peçonha de *Bothrops pirajai*.

• Análise proteômica da peçonha de *Bothrops pirajai*.

## 2.2. Objetivos específicos

• Isolamento de uma metaloprotease da classe P-I, a partir da peçonha bruta de *B. pirajai.* 

• Determinação da massa molecular.

• Determinação da atividade proteolítica da enzima sobre o fibrinogênio bovino na presença ou ausência de inibidores específicos.

• Determinação da atividade fibrinolítica e trombolítica da enzima sobre coágulos de fibrina e de sangue, *in vitro*.

• Avaliação dos efeitos de temperatura, pH e inibidores na atividade proteolítica da metaloprotease sobre o substrato azocaseína.

• Determinação do potencial hemorrágico da metaloprotease, com determinação da dose hemorrágica mínima (DHM).

• Avaliação da atividade coagulante da metaloprotease.

• Avaliação da atividade proteolítica da metaloprotease sobre componentes da membrana basal, como fibronectina, laminina e colágeno tipo IV, *in vitro*.

• Avaliação da atividade proteolítica da metaloprotease sobre a membrana basal *in vivo*.

• Avaliação da atividade miotóxica da metaloprotease sobre o músculo gastrocnêmio de camundongos.

• Avaliação do efeito citotóxico local da metaloprotease sobre o músculo gastrocnêmio e sistêmico sobre diferentes órgãos: rim, fígado, pulmão e coração da metaloprotease.

• Determinação do potencial pró-inflamatório da metaloprotease pela avaliação de seus efeitos edematogênicos e nociceptivos em ratos.

• Avaliação dos mediadores inflamatórios envolvidos nos efeitos próinflamatórios da metaloprotease. • Determinação da sequência de aminoácidos da metaloprotease por espectrometria de massas.

• Alinhamento múltiplo e análise comparativa com sequências de metaloproteases de outras peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*.

• Determinação da estrutura terciária da metaloprotease por modelagem molecular.

• Fracionamento da peçonha bruta de *B. pirajai* e caracterização proteômicas das frações por SDS-PAGE e MALDI-TOF/TOF.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Animais

Camundongos Swiss machos (18-25 g), Balb/c machos (18-22 g) e ratos Wistar machos (200-250 g) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto-SP, Brasil, ou pelo Comite Institucional para o Cuidado e Uso de Animais (CICUA), Universidade da Costa Rica. Os experimentos com animais foram conduzidos de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA) do campus de Ribeirão Preto-SP, da Universidade de São Paulo (n ° 07.1.1387.53.5).

#### 3.1.2. Peçonha

A peçonha de *Bothrops pirajai* foi adquirida do Serpentário de Proteínas Bioativas Ltda (Batatais-SP).

### 3.1.3. Plasma humano

O plasma humano utilizado nos experimentos de coagulação e atividade trombolítica foi obtido a partir do sangue de voluntários sadios na faixa etária de 20 a 40 anos, de ambos os sexos e que não receberam medicação durante dez dias anteriores aos experimentos. O sangue dos doadores foi colhido por punção venosa e coletados em tubos contendo citrato de sódio 3,8% (9:1, v/v) como anticoagulante, sendo em seguida centrifugado a 2.000 xg em temperatura ambiente, por 15 minutos para obtenção de plasma.

Todos os procedimentos envolvendo humanos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (CEP/FCFRP n° 53/2006).

## 3.1.4. Medicamentos

Os medicamentos metisergida, HOE-140, cimetidina, dexametasona, pirilamina, meloxicam, L-NMMA, tioperidamida, valeril salicilato, cromoglicato de sódio e ácido nordiidroguaiarético (NDGA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co.).

## 3.1.5. Matrigel

Matrigel<sup>®</sup> foi adquirido da BD Bioscience (BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA).

## 3.1.6. Toxinas

A metaloprotease BaP1 foi cedida gentilmente pela Dra. Tereza Escalante, Instituto Clodomiro Picado, Faculdade de microbiologia, Universidade da Costa Rica, Costa Rica.

## 3.1.7. Demais Reagentes e Materiais

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, e os demais materiais e equipamentos estão descritos na metodologia.

## 3.2. Isolamento da metaloprotease de Bothrops pirajai

A metaloprotease foi isolada da peçonha de *Bothrops pirajai* por meio de três etapas cromatográficas: exclusão molecular em resina Sephacryl S-200, troca iônica em CM-Sepharose e afinidade em resina Blue-Sepharose. As absorbâncias das frações cromatográficas foram medidas em comprimento de onda de 280 nm utilizando-se espectrofotômetro Thermo Scientific GENESYS 10UV.

## 3.2.1. Cromatografia de exclusão molecular em Sepharyl S-200

Inicialmente, 350 mg da peçonha bruta de *Bothrops pirajai* foi suspendida em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,0 e centrifugada por 10 minutos a 12000 *xg* em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi aplicado em coluna cromatográfica contendo resina Sephacryl S-200 (110 x 2,5 cm) previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio pH 8,0 e eluída com o mesmo tampão. Frações de 3 mL foram coletadas em um fluxo de 30 mL/h. A fração que apresentou maior atividade proteolítica sobre a azocaseína foi reunida e liofilizada.

## 3.2.2. Cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose

A fração obtida na etapa cromatográfica em Sephacryl S-200 foi diluída em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,0 e aplicada em coluna cromatográfica contendo resina CM-Sepharose (19,0 x 1,5 cm) conforme descrito por Andrião-Escarso e colaboradores

(2000). A coluna foi previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,0 e eluída com um gradiente de concentração continuo até 1,0 M de bicarbonato de amônio. Frações de 3,0 mL/tubo foram coletadas num fluxo de 24 mL/h. A fração proteolítica com baixa atividade hemorrágica foi concentrada e dessalinizada em sistema de ultrafiltração AMICON com membrana Ultracel YM-10, e em seguida liofilizada.

## 3.2.3. Cromatografia de afinidade em Blue-Sepharose

A fração obtida na etapa cromatográfica em CM-Sepharose foi ressuspendida em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,6 e plicada em coluna cromatográfica contendo resina Blue-Sepharose (10,0 x 1,8 cm) previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,6. A eluição foi realizada utilizando tampão Tris-HCl 0,01 M + NaCl 1,0 M pH 7,6. Frações de 2,0 mL/tubo foram coletadas num fluxo de 30 mL/h. A fração contendo a metaloprotease foi concentrada e dessalinizada em sistema de ultrafiltração AMICON com membrana Ultracel YM-10, e em seguida liofilizada.

#### 3.2.4. HPLC de fase reversa

A metaloprotease obtida na etapa cromatográfica em Blue Sepharose foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna  $\mu$ RPC C2/C18 ST 4.6/100, utilizando sistema ÄKTA<sup>TM</sup> purifier (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com solvente de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (Solvente A) e a metaloprotease foi diluída neste mesmo solvente e aplicada no sistema utilizando loop de 100  $\mu$ L. A eluição foi realizada com fluxo de 1,0 mL/min com gradiente de concentração linear de solvente contendo acetonitrila 70% e TFA 0,1% (Solvente B): 0-100% de solvente B em 30 volumes de coluna.

#### 3.3. Caracterização bioquímica

## 3.3.1. Determinação quantitativa de proteínas

A dosagem de proteínas em soluções foi realizada com o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) conforme método descrito por Bradford (1976). A curva padrão foi determinada a partir de diferentes concentrações (0,1 a 2,0 mg/mL) de albumina de soro bovino (BSA).

## 3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As frações cromatográficas e a metaloprotease isolada foram analisadas em gel de poliacrilamida a 12% (m/v) em condições redutoras, na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, e não redutoras na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970).

O gel de resolução a 12% (m/v) em acrilamida (bis-acrilamida:acrilamida 1:19 m/m) foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,8 e SDS 1%. O gel de concentração a 6% em acrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 0,1%. Tris-Glicina pH 8,3 foi utilizado como tampão de corrida (Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%).

Amostras foram dissolvidas em salina tamponada em fosfato (PBS), acrescidas de 5  $\mu$ L de tampão para amostras contendo Tris-HCl 0,05 M pH 6,5, glicerol 10% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 3,5% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,05% (m/v) e glicerol, e submetidas à fervura a 100°C por 4 minutos. O gel foi corado por 10 minutos em azul coomassie G-250 0,1% (p/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (40:50:10, v/v) e descorado em ácido acético 10%.

#### 3.3.3. Determinação da massa molecular

A massa molecular da metaloprotease isolada foi determinada tanto por migração eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) quanto por espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz, com analisador por tempo de voo (MALDI-TOF MS).

#### 3.3.3.1. Determinação por MALDI-TOF MS

As análises foram feitas em espectrômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF, modelo AXIMA Performance, Shimadzu Biotech, Manchester, UK) e os espectros de massa foram adquiridos no modo linear positivo, após calibragem do aparelho com padrões de proteína incluindo BSA, insulina, citocromo c, ribonuclease, apomioglobina e aldolase. As amostras foram diluídas em 50 µL de água Milli-Q e misturadas na proporção de 1:1 com a matriz composta de ácido sinapínico (10 mg/mL) em acetonitrila 50% e TFA 0,1%, e aplicadas na placa do MALDI. A faixa de massas moleculares avaliada foi de 3.000-80.000 m/z. Estas análises foram realizadas no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto em colaboração com o Prof. Dr. José César Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

## 3.3.3.2. Determinação por SDS-PAGE

SDS-PAGE realizada segundo metodologia descrita no item 3.3.2. A massa da metaloprotease foi estimada pela interpolação de uma curva logarítmica linear da massa molecular relativa das proteínas do padrão de massa molecular versus a distância de migração no gel. O padrão de massa molecular: SDS7 (Sigma-Aldrich) foi utilizado no decorrer do presente trabalho consistindo de sete proteínas com massas moleculares entre 14,2 e 66 kDa.

## 3.4. Caracterização enzimática

#### 3.4.1. Atividade proteolítica sobre azocaseína

A atividade proteolítica foi testada utilizando a azocaseína como substrato segundo protocolo descrito por Bernardes e colaboradores (2008). Diferentes doses da enzima foram adicionadas a 1 mL da solução de azocaseína (1 mg/mL) em 0,2 M Tris-HCl, 4 mM CaCl2 pH 8,0 e incubadas a 37 °C por 60 minutos. Em seguida foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (m/v) para precipitar a azocaseína não degradada. Após 20 minutos as soluções foram filtradas e a absorbância do filtrado medido em 366 nm. Uma unidade de atividade foi definida como um aumento de 0,01 unidades de absorbância a 366 nm, expressando os resultados como atividade específica (U/mg).

Para a avaliação da estabilidade da metaloprotease frente às variações de pH e temperatura, a enzima foi pré-incubada por 30 minutos em diferentes tampões de pHs (3,0; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0 e 10,5) e temperaturas (4, 25, 37, 60 e 100 °C) e sua atividade testada sobre o substrato azocaseína. Sobre esta atividade também foram avaliados a influência de diferentes inibidores a 5 mM (EDTA, EGTA, 1,10-Fenatrolina, benzamidina, leupeptina, aprotinina, DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol).

#### 3.4.2. Atividade proteolítica sobre azocolágeno

A atividade foi realizada segundo protocolo descrito por Váchová e Moravcová, (1993) com pequenas modificações. O azocolágeno foi dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05  $M + CaCl_2$  20 mM pH 7,6 na concentração de 5 mg/mL. Em seguida, alíquotas de 250  $\mu$ L da solução de azocolágeno foram acrescidas de 10  $\mu$ L de solução contendo a toxina isolada em diferentes doses. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 1 hora a 37 °C. A reação foi interrompida colocando as amostras em banho de gelo por 5 min e centrifugando-as por 15 min a 1677 *xg*. A absorbância do sobrenadante foi lida em microleitor de placas

(Powerwave XS2 Gen5 Data analysis software - Biotek) a 540 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de toxina necessária para causar o aumento de 0,01 unidades de absorbância e expressa em U/mg.

#### 3.4.3. Atividade proteolítica sobre fibrinogênio

Esta atividade foi determinada segundo a técnica descrita por Edgar e Prentice (1973), com algumas modificações de acordo com Bernardes e colaboradores (2008). Amostras da proteína em diferentes quantidades (5 e 10  $\mu$ g) foram incubadas por 1 hora a 37 °C com a solução de fibrinogênio (3 mg/mL). A reação foi interrompida com a adição de 10  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 6,5, contendo glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 10% (v/v), SDS 2% (v/v) e azul de bromofenol 0,05% (m/v), seguida por fervura a 100 °C por 4 minutos. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE a 12%, como descrito anteriormente no item 3.3.2. O teste de neutralização da atividade proteolítica foi realizado através da pré-incubação de 5  $\mu$ L de EDTA (5 mM) com as amostras da protease separadamente por 30 minutos à 37 °C, e em seguida incubada com a solução de fibrinogênio por 1 hora a 37 °C. Ao término da incubação foi adicionado tampão desnaturante às amostras, sendo estas submetidas à fervura por 4 min e aplicadas em gel de eletroforese na presença de SDS.

## 3.4.4. Atividade proteolítica sobre fibrina

O ensaio de atividade fibrinolítica foi realizado de acordo com o método previamente (LEITÃO; POLIZELLO; ROTHSCHILD, 2000), incubando-se descrito diferentes quantidades (1, 2,5, 5, 10 e 15 µg) da metaloprotease em placas de Petri contendo fibrina. Foi preparada uma solução de fibrinogênio 0,3% (vol. final de 10 mL), e solução de agarose 0.95% sob aquecimento até a formação de um colóide transparente (vol. final = 10 mL), sendo que ambas as soluções foram preparadas em tampão barbital 50 mM, pH 4,6 contendo CaCl<sub>2</sub> 1,66 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,68 mM, NaCl 94 mM e azida sódica 0,02%. Após o resfriamento da solução de agarose (± 40 °C) adicionou-se a solução de fibrinogênio (fibrinogênio:agarose; 1:1; v/v). A mistura (fibrinogênio-agarose) foi coagulada com 100 µL de uma solução contendo trombina bovina (1  $\mu g/\mu L$ ), e a solução foi então vertida em placas de Petri para a coagulação. As placas contendo o coágulo foram mantidas a 4 °C e após 30 min, com auxílio de uma ponteira, pequenas cavidades (5 mm de diâmetro) foram feitas sobre o coágulo de fibrina para a aplicação das amostras nas concentrações desejadas, em volume final de 30  $\mu$ L, seguindo com incubação por 24 h à 37 °C. A atividade fibrinolítica foi avaliada visualmente e

quantificada em cm de acordo com os halos de lises produzidos, comparando-se com um controle positivo (peçonha bruta de *Bothrops pirajai*) e um controle negativo (PBS).

## 3.4.5. Atividade trombolítica

A atividade trombolítica da metaloprotease foi avaliada sobre coágulos sanguíneos formados *in vitro* colocando 500  $\mu$ L de sangue fresco (coletado de voluntários como descrito no item 3.1.3, na ausência de anticoagulante) em placas de 24 poços e deixando o mesmo coagular por 1 h em temperatura ambiente. Após este período, os coágulos foram incubados por 24 horas a 37 °C com diferentes quantidades da enzima (25, 50 e 100  $\mu$ g em 500  $\mu$ L de PBS), utilizando PBS (500  $\mu$ L) e peçonha bruta de *B. pirajai* (30  $\mu$ g em 500  $\mu$ L de PBS) como controles negativo e positivo, respectivamente. Após incubação, a atividade trombolítica foi estimada baseando-se no tamanho do coágulo remanescente, medindo dois ângulos retos e expressando os resultados em centímetros, conforme descrito por Cintra e colaboradores (2012).

## 3.4.6. Atividade proteolítica sobre componentes da membrana basal in vitro

## 3.4.6.1. Atividade proteolítica sobre componentes isolados da MB

Esta atividade foi avaliada por SDS-PAGE usando gradiente de acrilamida 4-15% segundo protocolo descrito por Rucavado e colaboradores (1995). Foram utilizados como substratos fibronectina e colágeno tipo IV. Os substratos (2 mg/mL) foram pré-incubados à 37 °C com a metaloprotease (10  $\mu$ g) em diferentes intervalos de tempo (30 minutos, 1, 3 e 6 horas). A reação foi interrompida com 10  $\mu$ L de tampão desnaturante Tris-HCl 0,05 M, pH 6,5, contendo glicerol 10% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 10% (v/v), SDS 2% (v/v) e azul de bromofenol 0,05% (m/v).

## 3.4.6.2. Atividade proteolítica sobre Matrigel

O Matrigel é um mistura de diferentes proteinas da MB, composta principalmente por laminina, colágeno tipo IV, perlecan e nidogênio. Esta mistura se assemelha ao complexo ambiente extracelular encontrado em muitos tecidos. A hidrólise do Matrigel foi avaliada pela incubação do substrato com a metaloprotease (15 µg) por diferentes tempos de incubação (1, 3 e 6 horas) a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 5 µL de tampão desnaturante para SDS-PAGE. Uma amostra de Matrigel, sem a toxina, foi incubada em condições idênticas e utilizada como controle. A eletroforese foi realizada utilizando gel gradiente 4-

15% de poliacrilamida, e as bandas foram visualizadas com Coomassie Brilliant Blue (ESCALANTE et al., 2006). O padrão de massa molecular utilizado foi Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas Life Sciences) composto por proteínas com massas moleculares entre 10 e 260 kDa. Fragmentos gerados da degradação do matrigel pela metaloprotease BpirMP e visualizados no gel de eletroforese foram selecionados para posterior análise em espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems 4800-Plus). As bandas mais evidentes foram selecionadas, recortadas do gel de eletroforese e submetidas à digestão enzimática com tripsina (Sigma-Aldrich) e analisadas em espectrômetro de massas. Os resultados obtidos por MS foram submetidos ao banco de dados NCBI e Swiss-Prot utilizando o site BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

A atividade proteolítica da toxina BpirMP sobre o substrato Matrigel foi comparada à atividade da metaloprotease BaP1 nos tempos de 1 e 3 h de incubação conforme metodologia acima.

A hidrólise de Matrigel foi avaliada também por Western Blot utilizando anticorpos contra constituintes de membrana basal como laminina, nidogênio e colágeno tipo IV (ESCALANTE et al., 2011). Resumidamente, as incubações foram realizadas como descrito acima neste item e as reações foram interrompidas pela adição de 100  $\mu$ L de tampão RIPA, contendo 20 mM de EDTA, e congeladas a -70 °C. 20 µL de cada amostra foram separados em um gel de eletroforese em gradiente de poliacrilamida de 4-15% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) durante toda a noite a 70 mV. Após a transferência, as membranas foram coradas com corante Ponceau S para visualizar a transferência. As membranas foram lavadas com tampão TBS contendo 2% de leite de baixo teor de gordura por 1 h para bloqueio. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas durante toda a noite a 4 °C, sob agitação, com um dos seguintes anticorpos: policional de coelho anti-laminina na proporção 1:10000 (Fitzgerald), anticorpo policional de coelho anti-colageno tipo IV na proporção 1:2000 (Abcam), anticorpo policional de coelho anti-nidogênio 1 na proporção 1:10000 (Abcam). Após a incubação, as membranas foram lavadas cinco vezes, 20 minutos cada, com tampão TBS + Tween 20 e novamente incubadas com o conjugado peroxidase antirato IgG (Jackson Immunoresearch) por 1 h. Após o tempo de incubação, as membranas foram novamente lavadas com o tampão TBS + Tween 20 por 1 h. A reação foi revelada utilizando um substrato quimioluminescente, kit de Novex (Invitrogen) e as imagens foram capturadas com ChemiDoc XRS<sup>+</sup> (BioRad). A análise foi realizada utilizando ImageLab software (BioRad).

## 3.4.7. Degradação de componentes da membrana basal in vivo

Os efeitos das metaloproteases BaP1 e BpirMP em proteínas da MB *in vivo* foram estudados injetando as enzimas ou PBS no músculo gastrocnêmio direito de camundongos. Os grupos (3 animais por grupo) foram injetados intramuscularmente, no gastrocnêmio direito com 50  $\mu$ g de BaP1 ou de BpirMP dissolvidos em 50  $\mu$ L de PBS. O grupo controle foi injetado com 50  $\mu$ L de PBS. Após 15 min e 1 h da injeção, os animais foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub>, os músculos foram dessecados e congelados em nitrogênio líquido, para análises por Western Blot.

Os músculos congelados em nitrogênio líquido foram pulverizados em um almofariz até formar partículas finas. Todos os músculos de cada tratamento experimental foram pulverizados em conjunto a fim de preparar um pool. Cada pool foi ressuspenso em 1,5 mL em tampão RIPA + Uréia 8M, no qual foi adicionada uma pastilha composta por um cocktail inibidor de protease (Roche), e incubou-se durante 2 h em gelo com ligeira agitação. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi distribuído em alíquotas e armazenado a -70 °C até a análise. Para a realização do imunoblotting, 20 µL de cada amostra foram separados em géis gradiente de poliacrilamida 4-15% e transferidos para membranas de nitrocelulose e a reação detectada como descrito no item 3.4.6.2. Os anticorpos utilizados foram: anticorpo policional de coelho anti-laminina na diluição de 1:500 (Abcam), anticorpo policional de coelho anti-colágeno tipo IV na proporção de 1:500 (Abcam) e anticorpo policional de coelho anti-nidogênio 1 na proporção 1:8000 (Abcam). A reação foi revelada utilizando um substrato quimioluminescente, kit de Novex (Invitrogen). As imagens foram capturadas com ChemiDoc XRS<sup>+</sup> (BioRad) e a análise realizada com o software ImageLab (BioRad). Todos os experimentos foram realizados no Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica, com a orientação do Dr. José M. Gutiérrez e da Dra. Teresa Escalante.

#### 3.5. Caracterização funcional

#### 3.5.1. Atividade hemorrágica

Esta atividade foi realizada segundo método descrito por Nikai e colaboradores (1984). As amostras contendo 15  $\mu$ g de peçonha bruta ou 25, 50 e 100  $\mu$ g de BpirMP foram dissolvidas em 50  $\mu$ L de PBS e injetadas por via intradérmica no dorso de camundongos Swiss machos de 18-22 g (n=3). Como controle negativo foi utilizado 50 $\mu$ L de PBS. Após 3 h, os animais foram eutanasiados com CO<sub>2</sub>, as peles removidas e os halos hemorrágicos

medidos em dois ângulos retos (diâmetros) e expressos em mm. Define-se como dose hemorrágica mínima (DHM) a dose mínima de cada amostra necessária para induzir a formação de um halo com 10 mm de diâmetro.

#### 3.5.2. Atividade coagulante

A capacidade da toxina em coagular o plasma foi avaliada em microleitor PowerWave XS2 (BioTek), monitorando a absorbância a 405 nm por 30 minutos pelo programa Gen5 Data Analysis. Para isso, 200  $\mu$ L de plasma citratado foram misturados com 50  $\mu$ L de PBS contendo diferentes quantidades da proteína (1, 5, 10, 25 e 50  $\mu$ g) e incubados a 37 °C. A cinética de coagulação da enzima foi avaliada por 30 minutos e comparada aos controles positivos feitos utilizando-se apenas plasma e 50  $\mu$ L de solução de peçonha bruta de *B. pirajai* (10  $\mu$ g).

#### 3.5.3. Atividade miotóxica

Os grupos (n=4) (Swiss 18-22 g) foram injetados no músculo gastrocnêmio direito com a toxina BpirMP ou a peçonha bruta de *B. pirajai* (50 µg) dissolvidas em 50 µL de PBS. O grupo controle foi injetado com 50 µL de PBS. Após diferentes intervalos de tempo (1, 3, 6 e 24 h) o sangue dos animais foi coletado, por cortes na extremidade da calda, em capilares heparinizados. As amostras coletadas foram centrifugadas a 3000 *xg* por 10 minutos. A atividade da enzima creatina cinase (CK) foi determinada utilizando 4 µL de plasma com 1,0 mL de reativo do Kit CK-NAC UV cinético (Wiener Laboratórios, Rosário, Argentina), incubados por 3 min à 37 °C, realizando as leituras em 340 nm após 3 minutos. A atividade creatina cinase foi expressa em unidades/litro.

#### 3.5.4. Análise histopatológica

Foram utilizados três camundongos Swiss machos (28-30 g) para cada grupo controle e teste. Os animais do grupo controle receberam injeções por via intramuscular (50  $\mu$ L) de PBS no músculo gastrocnêmio direito ou intraperitoneal (50  $\mu$ L) de PBS para análise dos órgãos. Os grupos teste receberam injeções contendo a protease BpirMP na dose de 50  $\mu$ g/animal, dissolvida em PBS. Os animais foram sacrificados após 24 h, a parede anterior do tórax e da cavidade abdominal foram abertas para a coleta das vísceras estudadas (fígado, pulmão, rim e coração). O mesmo procedimento foi usado para retirada do gastrocnêmio direito na região posterior da perna. A seguir, os fragmentos foram lavados com solução PBS e mantidos em solução fixadora (formol 10%), por 24 horas, desidratados em série crescente de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina, de acordo com o padrão histológico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000). Os cortes semi-seriados foram obtidos com 5 μm de espessura, que logo a seguir foram corados pelo método de hematoxilina-eosina. As imagens histopatológicas foram capturadas por uma câmera digital JVC - TKC1380 acoplada a um microscópio binocular Nikon Eclipse E600, e depois transferidas e armazenadas por um software Adobe Premiere 5.1. Equipamentos e materiais para a análise histológica foram fornecidos pelo Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU, de responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti.

Na análise histológica realizada no Instituto Clodomiro Picado, sob a supervisão do Dr. José M. Gutiérrez e da Dra. Alexandra Rucavado, foram utilizados grupos de três camundongos Swiss machos (18-22 g). Os animais do grupo controle receberam injeções por via intramuscular (50  $\mu$ L) de PBS no músculo gastrocnêmio direito. Os grupos teste receberam injeções contendo a protease isolada BpirMP nas doses de 50 e 100  $\mu$ g/animal, dissolvidas em 50  $\mu$ L de PBS. Os animais foram sacrificados após 1 h para retirada do músculo gastrocnêmio direito. Os cortes foram feitos e corados como descrito acima.

## 3.5.5. Atividade edematogênica

Os ensaios da atividade edematogênica foram realizados no laboratório de Biologia Molecular e Celular (Instituto de Ciências Biomédicas), na Universidade Federal de Uberlândia em colaboração com o Prof. Dr. Fábio de Oliveira e Dra. Leonilda Stanziola. O edema induzido pela BpirMP foi avaliado em ratos Wistar machos (200-250 g). Grupos de animais (n = 5) receberam a enzima BpirMP diluída em salina estéril (0,15 M) e injetada por via intraplantar na pata esquerda dos animais (50  $\mu$ L). A pata direita recebeu salina como controle. O volume de ambas as patas foram medidos usando pletismômetro (Ugo Basile, Itália, modelo 7140). Os volumes foram medidos em diferentes intervalos de tempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas) e utilizando diferentes doses (5, 15, 35 e 50  $\mu$ g/animal). Os resultados foram calculados a partir da diferença entre os valores obtidos em ambas as patas e expressos em porcentagem de aumento do volume da pata em relação às medidas iniciais.

## 3.5.6. Avaliação da hiperalgesia

Os ensaios de avaliação da hiperalgesia foram realizados no laboratório de Biologia Molecular e Celular (Instituto de Ciências Biomédicas), na Universidade Federal de Uberlândia em colaboração com o Prof. Dr. Fábio de Oliveira e Dra. Leonilda Stanziola. Os animais utilizados para avaliar a hiperalgesia induzida pela metaloprotease foram os mesmos utilizados para a avaliação da atividade edematogênica, já que os experimentos foram realizados simultaneamente. O limiar de dor foi medido em diferentes momentos após a injeção de solução salina ou da toxina com o aparelho de pressão Ugo-Basile, como descrito por Randall e Selitto (1957). O peso em gramas (g) necessário para provocar uma resposta nociceptiva, flexão da pata, foi determinado como o limiar nociceptivo. Um valor de corte de 300 g foi usado para evitar danos às patas. O limiar nociceptivo foi medido antes e 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas após a injeção da toxina. Os resultados foram calculados como a diferença entre ambas as patas e expresso em percentagem do decréscimo do limiar nociceptivo em relação ao limite inicial. Para reduzir o estresse, os ratos foram habituados ao aparelho um dia antes dos experimentos.

#### 3.5.7. Mediadores inflamatórios

Os ensaios para avaliação dos mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida pela metaloprotease BpirMP foram realizados no laboratório de Biologia Molecular e Celular (Instituto de Ciências Biomédicas), na Universidade Federal de Uberlândia em colaboração com o Prof. Dr. Fábio de Oliveira e Dra. Leonilda Stanziola. Após a seleção da melhor dose-resposta para indução de edema e hiperalgesia, animais (n = 4) foram prétratados com diferentes drogas para a avaliação de possíveis mediadores inflamatórios envolvidos no processo: Cimetidina, antagonista seletivo para receptor H2 para histamina (15 mg/kg, i.p., 30 min antes), dexametasona, inibidor atividade PLA<sub>2</sub> (2,5 mg/kg, i.p., 60 min antes), HOE-140, antagonista receptor B2 para bradicinina (10 µg/pata, i.pl., simultâneo), Pirilamina, antagonista seletivo do receptor H1 para histamina (4 mg/kg, i.p., 30 min antes), meloxicam, inibidor seletivo para ciclooxigenase-2 (COX-2) (200 µg/pata i.p., 30 min antes), L-NMMA, inibidor seletivo da oxido nítrico sintase (100 µg/pata, i.pl., simultâneo), tioperidamida, inibidor seletivo dos receptores H3/H4 para histamina (10 mg/kg, i.p., 30 min antes), valeril salicilato, inibidor seletivo para ciclooxigenase-1 (COX-1) (50 mg/Kg), cromoglicato de Sódio, inibidor de degranulação de mastócito (10 mg/Kg) e ácido nordiidroguaiarético (NDGA), inibidor seletivo para lipooxigenase (100 mg/Kg, simultaneamente). Os resultados foram calculados a partir da diferença entre os valores obtidos em ambas as patas (controle: PBS e teste: toxina) e expresso em porcentagem em relação às medidas iniciais. As doses de cada medicamento foram selecionadas em ensaios prévios utilizando carragenina como indutor inflamatório e baseadas em artigos científicos

descrevendo a utilização desses medicamentos para inibição do edema de pata induzido por peçonhas de serpentes e/ou toxinas isoladas.

## 3.5.8. Análise do exsudato inflamatório peritoneal

Camundongos Balb/C (3 animais/grupo experimental) foram injetados via intraperitoneal com 500  $\mu$ L de PBS (controle negativo) ou soluções contendo diferentes concentrações da metaloprotease de *B. pirajai* (25; 50 e 100  $\mu$ g diluídos em 500  $\mu$ L de PBS). Após 6 e 24 h, os animais foram submetidos à eutanásia pela instilação de CO<sub>2</sub>. Para análise das células inflamatórias, a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de PBS gelado, drenando assepticamente o exsudato com auxílio de uma seringa e transferindo para tubos plásticos de 15 mL, mantidos em seguida em banho de gelo. A contagem do número total de leucócitos presentes no lavado foi feita analisando cada amostra de exsudato, diluída em solução de Turk (1/20), em câmara de Neubauer. Para realizar a contagem diferencial dos leucócitos em neutrófilos e células mononucleares, amostras de células (100  $\mu$ L do lavado peritoneal dos diferentes grupos experimentais) foram concentradas em lâminas de microscópio utilizando citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon Souther Products Ltd., UK), coradas com corante de Romanowsky e analisadas em microscópio óptico (Bioval), magnificação 400X. Foram contadas 300 células por lâmina e os resultados foram expressos pelas porcentagens médias de cada tipo celular observado.

## 3.6. Caracterização estrutural

## 3.6.1. Determinação da estrutura primária da BpirMP

A determinação da estrutura primária da toxina foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Bruno Lomonte, do Instituto Clodomiro Picado – San José, Costa Rica. Inicialmente, 500 µg da metaloprotease foram submetidas à digestão enzimática com tripsina, quimotripsina e Glu-C (*Staphylococcus aureus* V8) de acordo instruções do fabricante. Os fragmentos gerados foram separados em HPLC em coluna C4 de fase reversa utilizando os solventes A: ácido fórmico 0,1% em água Milli-Q, e B: ácido fórmico 0,1% em acetonitrila. Os peptídeos ligados à coluna foram eluídos com o seguinte gradiente: 1- 40% de solvente B em 20 minutos, seguido de um gradiente 40 a 60% de solvente B em 5 minutos, com fluxo de 1mL/minuto. As frações coletadas foram secas em SpeedVac e ressuspendidas em matriz contendo ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL) e aplicadas manualmente na placa de MALDI Opti-TOF 384 (ABSciex), que foi então deixada em temperatura ambiente para cristalização completa da matriz. As amostras foram analisadas no modo refletor positivo utilizando um espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems 4800-Plus). Espectros foram obtidos utilizando uma intensidade do laser de 3000 e 1625 tiros por espectro, após calibração externa MS e MS/MS com padrões CalMix-5 padrões (ABSciex). Os espectros obtidos foram analisados utilizando ProteinPilot v.4.0.8 (ABSciex) para identificar proteínas em um nível de confiança de 99%.

Os dados gerados por MS foram submetidos aos bancos de dados NCBI e Swiss-Prot utilizando os sites BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) e MASCOT (http://www. matrixscience.com/search\_form\_select.html) na tentativa de identificar sequências homólogas de proteínas para fins comparativos.

## 3.6.2. Alinhamento múltiplo

A sequência parcial de aminoácidos da metaloprotease foi comparada com outras sequências de metaloproteases, depositadas no banco de dados Protein Data Bank, por alinhamento múltiplo utilizando o programa ClustalX versão 2.0.11. (http://www.clustal.org/).

#### 3.6.3. Modelagem teórica da metaloprotease

Inicialmente, o alinhamento entre a sequência de aminoácidos da metaloprotease BpirMP e outras proteínas homólogas depositadas no Protein Data Bank (RCSB PDB) (http://www.rcsb.org/) foi realizado com o emprego do programa on-line HHpred (http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred), uma ferramenta de modelagem molecular baseada em técnicas de reconhecimento de folding (threading). Com base nos critérios de avaliação do programa HHPred (score = 349, identidade do molde em relação à proteína-alvo = 88,0%), a cadeia A do modelo cristalográfico da metaloprotease BmooMP- $\alpha$  isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* (código PDB 3GBO) foi selecionada como o molde mais adequado para a construção do modelo teórico da BpirMP. Os modelos foram então gerados pelo programa Modeller 9.10 (MARTI-RENOM et al., 2000) e, em seguida, analisados com o emprego do programa PROCHECK v.3.5.4 (LASKOWSKI et al., 1993).

## 3.7. Análise proteômica da peçonha bruta de B. pirajai

#### 3.7.1. Fracionamento da peçonha bruta por HPLC de fase reversa

O fracionamento foi realizado segundo metodologia descrita por Lomonte e colaboradores (2012). Para o fracionamento da peçonha bruta em HPLC fase reversa, 2,5 mg

da peçonha foram dissolvidos em 200 µL de água contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA; solução A), centrifugadas durante 5 minutos a 15000 *xg*, aplicada a uma coluna C18 (250 x 4,6 mm, Teknokroma) usando um cromatógrafo Agilent 1200. A eluição foi realizada com fluxo de 1mL/min, aplicando um gradiente de concentração da solução B (acetonitrila, contendo 0,1% de TFA), da seguinte forma: 5% B durante 5 min, 5-15% de B durante 10 min, 15-45% B durante 60 min, e B 45-70% ao longo de 12 min. A absorbância foi monitorizada a 215 nm e as frações foram coletadas manualmente, reunidas e secas em uma centrifuga a vácuo, SpeedVac (Savant) para posterior caracterização. A abundância relativa de cada proteína (% do total de proteína da peçonha) foi estimada por integração dos sinais de pico a 215 nm, utilizando-se ChemStation B.04.01 (Agilent). Quando um pico de amostra do HPLC continha duas ou mais bandas na SDS-PAGE, suas abundâncias relativas foram estimadas por densitometria utilizando ImageLab (Bio-Rad).

## 3.7.2. Caracterização das frações obtidas por RP-HPLC

As frações obtidas após RP-HPLC foram separadas por SDS-PAGE sob condições redutoras em SDS-PAGE 15%. As bandas de proteína foram excisadas dos géis de eletroforese e submetidas à redução com DTT (10 mM) e alquilação com iodoacetamida (50 mM), seguido de digestão em gel com tripsina bovina (em bicarbonato de amônio 25 mM, 10% de acetonitrila) durante toda a noite em digestor automático (ProGest Digilab), de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos resultantes foram analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF. Misturas de 0,5  $\mu$ L de  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico e 0,5 mL de cada amostra foram aplicadas manualmente na placa de MALDI Opti-TOF 384 (ABSciex), que foi então deixada em temperatura ambiente para cristalização completa da matriz. Após a cristalização, as amostras foram analisadas no modo refletor positivo utilizando um espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems 4800-Plus). Os espectros foram adquiridos utilizando um laser de intensidade de 3000 e 1500 tiros/espectro, utilizando como padrão externo CalMix-5 (ABSciex) aplicado na mesma placa. Os espectros resultantes foram analisados usando ProteinPilot v.4 (ABSciex) para identificar proteínas utilizando a base de dados UniProt / SwissProt (20100622) a um nível de confiança de 99%. Os espectros foram interpretados com o auxílio da ferramenta BioAnalyst e as sequências deduzidas foram submetidas ao BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) para atribuição das famílias de proteínas e grau de similaridade.

## 3.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos pelas médias dos valores e desvios padrões (SD). A significância estatística dos resultados foi avaliada utilizando a análise de variância (ANOVA) considerando os valores de p < 0,05 como significativos.

# RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Isolamento da metaloprotease BpirMP

A metaloprotease BpirMP foi isolada da peconha de Bothrops pirajai por meio de três passos cromatográficos. Na primeira etapa, 350 mg de peçonha foi aplicada em coluna cromatográfica contendo resina de exclusão molecular Sephacryl S-200 resultando em 4 frações (Fig 4A). As frações obtidas foram testadas quanto à atividade proteolítica sobre a azocaseína, sendo que a fração S-II, a que apresentou maior atividade proteolítica. Depois de liofilizada, a fração S-II foi ressuspendida em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,0 e submetida a uma nova etapa cromatográfica em resina de troca iônica CM-Sepharose, resultando em cinco frações: P-I a P-V (Fig. 4B). As frações foram testadas quanto à atividade proteolítica e atividade hemorrágica. A fração P-II foi a que apresentou alta atividade proteolítica, porém com baixa atividade hemorrágica, além de proteínas na faixa de 25 kDa. A fração P-II foi dessalinizada e liofilizada. Depois de liofilizada, esta fração foi aplicada em coluna de afinidade Blue-Sepharose resultando em duas frações principais (Fig. 4C). As frações foram analisadas por SDS-PAGE sendo que a fração B-II apresentou atividade proteolítica além de uma banda única. O processo de isolamento foi repetido várias vezes com o objetivo de obter amostra para a realização da caracterização funcional e estrutural da enzima. A enzima isolada foi analisada também, em RP-HPLC em coluna C2/C18 para avaliar o grau de pureza da amostra (Fig. 5). A metaloprotease isolada, denominada BpirMP, apresentou cadeia única como visualizado no gel de eletroforese da figura 6.



**Figura 4. Purificação da metaloprotease da peçonha de** *Bothrops pirajai* (A) Coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200 (2 x 110 cm) previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 0,05 M pH 8,0. Condições: 350 mg de peçonha dissolvida em 5,0 mL de bicarbonato de amônio 0,05 M. (B): A fração S-II foi aplicada em CM-Sepharose (2,0 x 20,0 cm) previamente equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,0. (C) Coluna Blue-Sepharose (2,0 x 14,0 cm) previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,6. A eluição foi realizada com tampão Tris-HCl 0,01 M + NaCl 1,0 M pH 7,6; (D): SDS-PAGE: Linha 1: Padrão de massa molecular, linha 2 BpirMP reduzida (30 µg), Linha 3: BpirMP não reduzida (30 µg).



**Figura 5.** Análise do grau de pureza da metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pirajai*. Perfil da enzima isolada BpirMP em coluna de fase reversa C2C18 em HPLC usando sistema AKTA Purifier. A eluição foi realizada com TFA 0,1% (solução A) e acetonitrila 70% + TFA 0,1% (solução B), em fluxo de 1 mL/minuto.

## 4.2. Determinação da massa molecular

A massa molecular da metaloprotease foi avaliada inicialmente por SDS-PAGE (Fig. 6). A estimativa da massa molecular foi realizada pela interpolação de uma curva logarítmica linear da massa molecular relativa das proteínas do padrão versus a distância de migração no gel, obtendo a massa aproximada de 23,5 kDa para a metaloprotease (resultados não mostrados).



**Figura 6. SDS-PAGE a 12% da metaloprotease BpirMP isolada de** *B. pirajai.* Linha: 1-Padrão de massa molecular; 2- BpirMP 3 µg; 3- BpirMP 5 µg; 4- BpirMP 10 µg.

A massa da metaloprotease isolada foi avaliada também por espectrometria de massas em MALDI-TOF em modo linear apresentando massa molecular de 23,1 kDa (Fig. 7). O espectro mostra também picos de massas menores de 15 kDa, possivelmente de produtos de degradação ou pequenos contaminantes da amostra, além de um pico com duas vezes a massa da metaloprotease (46,2 kDa) que possivelmente corresponde a um dímero da metaloprotease formado na amostra analisada.



**Figura 7. Espectrometria de massas da metaloprotease BpirMP isolada da peçonha de** *B. pirajai.* A análise foi realizada em espectrômetro de massas tipo TOF com fonte MALDI e o espectro de massa foi adquirido no modo linear positivo.

## 4.3. Caracterização enzimática da metaloprotease BpirMP

#### 4.3.1. Atividade proteolítica sobre azocaseína e azocolágeno

A enzima isolada apresentou atividade proteolítica sobre o substrato azocaseína (**Fig. 8**) e azocolágeno (**Fig. 9**) variando de acordo com a dose utilizada. A atividade proteolítica sobre a azocaseína foi utilizada para avaliar a estabilidade da proteína em diferentes condições de pH (**Fig. 10A**) e temperatura (**Fig. 10B**) e após prévia incubação com diferentes inibidores (**Fig. 11**).



Figura 8. Atividade proteolítica da metaloprotease de *B. pirajai* sobre a azocaseína. Diferentes quantidades da enzima (5, 10, 20, 40, 60 e 80  $\mu$ g) foram colocadas para reagir com a azocaseína (1 mg/mL, concentração final) por 60 min a 37 °C. Os resultados foram obtidos a 366 nm e expressos pela média ± SD (n=3) da atividade específica de proteína (U/mg). \*Valores significativamente diferentes dos demais grupos (p<0,05).



Figura 9. Atividade proteolítica da metaloprotease de *B. pirajai* sobre o azocolágeno. Diferentes quantidades da enzima (1, 5, 10, 15, 30, 45 e 60  $\mu$ g) foram colocadas para reagir com o azocolágeno (5 mg/mL, concentração final) por 60 min a 37 °C. Os resultados foram obtidos a 540 nm e expressos pela média ± SD (n=3) da atividade específica de proteína (U/mg). (\*) Valores significativamente diferentes dos demais grupos (p<0,05).

A variação de pH (Fig. 10A) mostrou que a atividade proteolítica da metaloprotease é maior na faixa de pH entre 6,0 a 10,5 sendo sensível a uma faixa de pH mais ácido (3,0 e 4,5) com redução significativa da atividade proteolítica. Os resultados para as variações de temperatura (Fig. 10B) mostram que a atividade proteolítica da metaloprotease é maior na faixa entre 4 e 37 °C sendo reduzida significativamente em temperaturas próximas e acima de 60 °C.

Na figura 11 podemos observar que a atividade da metaloprotease foi inibida após a pré-incubação com os inibidores de metaloprotease EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina enquanto que a pré-incubação com os inibidores de serinoproteases aprotinina, benzamidina e leupeptina não resultou em inibição da atividade proteolítica da enzima. O tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol e DTT também apresentou redução significativa na atividade proteolítica da enzima.



Figura 10. Influência do pH e temperatura na atividade proteolítica da metaloprotease de *B. pirajai* sobre a azocaseína. A enzima (10  $\mu$ g) foi previamente incubada com diferentes tampões de (A) pHs (3,0; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0 e 10,0) ou diferentes (B) temperaturas (4, 25, 37, 60 e 100 °C) por 30 min e em seguida, colocadas para reagir com azocaseína (1 mg/mL, concentração final) por 60 min a 37 °C. Os resultados foram obtidos a 366 nm e expressos pela média  $\pm$  SD (n=3) e expressos (U/mg). (\*) Valores significativamente diferentes dos demais grupos (p < 0,05).



Figura 11. Influência de inibidores na atividade proteolítica da metaloprotease de *B. pirajai* sobre a azocaseína. A enzima (10  $\mu$ g) foi previamente incubada com diferentes inibidores (5 mM) por 30 min a 37 °C e em seguida, colocadas para reagir com azocaseína (1 mg/mL, concentração final) por 60 min a 37 °C. Os resultados foram obtidos a 366 nm e expressos pela média ± SD (n=3) e expressos em (U/mg). (\*) Valores significativamente diferentes do grupo controle: BpirMP (p<0,05).

## 4.3.2. Atividade fibrinogenolítica

A metaloprotease apresentou atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, sendo que 5  $\mu$ g a BpirMP degradou a cadeia A $\alpha$  e parcialmente a cadeia B $\beta$  do fibrinogênio (**Fig. 12**). Na dose de 10  $\mu$ g a metaloprotease BpirMP foi capaz de degradar completamente as cadeias a $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio, sem agir sobre a cadeia  $\gamma$ . A atividade da metaloprotease sobre o fibrinogênio pode ser evidenciada pelo aparecimento de produtos de degradação não visualizados no controle. A atividade da enzima foi inibida quando a BpirMP foi pré-incubada com o agente quelante EDTA.



Figura 12. Atividade fibrinogenolítica da metaloprotease BpirMP isolada da peçonha de *B. pirajai*. A enzima foi incubada com fibrinogênio bovino (3 mg/mL) a 37 °C durante 1h e a atividade foi avaliada em SDS-PAGE a 12%. Linha 1: fibrinogênio controle; Linha 2: fibrinogênio + BpirMP 5  $\mu$ g; Linha 3: fibrinogênio + BpirMP 10  $\mu$ g; Linha 4: fibrinogênio + BpirMP 10  $\mu$ g + EDTA.

## 4.3.3. Atividade fibrinolítica e trombolítica

Os resultados da atividade fibrinolítica da metaloprotease BpirMP mostram que a enzima é capaz de degradar fibrina de maneira dose dependente (Fig. 13A). A enzima também apresentou atividade trombolítica (Fig. 13B) dissolvendo completamente os coágulos de sangue formados *in vitro* na maior dose testada após 24 horas de incubação.



Figura 13. Atividade fibrinolítica e trombolítica *in vitro* da metaloprotease de *B. pirajai*. (A) A atividade fibrinolítica foi avaliada pela medição dos halos de lise (em cm) resultantes após incubação das placas de fibrina com diferentes doses da metaloprotease BpirMP por 24 h a 37 °C. (B) A atividade trombolítica foi avaliada sobre coágulos sanguíneos formados *in vitro* e incubados com diferentes doses da metaloprotease por 24 h a 37 °C, estimando os resultados com base no tamanho do coágulo remanescente (em cm) após este período de incubação. Resultados expressos pela média  $\pm$  SD (n=3). (\*) Valores significativamente diferentes do controle negativo (PBS) (p < 0,05).

## 4.3.4. Atividade coagulante sobre o plasma

A atividade coagulante da toxina foi testada incubando diferentes doses da BpirMP (1, 5, 10, 25 e 50  $\mu$ g) com 200  $\mu$ L de plasma humano. O tempo de coagulação foi observado por 30 minutos em microleitor de placas e não foi observada presença de formação de coágulo em nenhuma das doses testadas.

## 4.3.5. Atividade proteolítica sobre componentes da membrana basal in vitro

#### 4.3.5.1. Atividade proteolítica sobre substratos isolados da MB

A atividade da metaloprotease sobre os componentes da MB como fibronectina e colágeno tipo IV foi avaliada por SDS-PAGE em gel gradiente de acrilamida 4-15 % para visualização dos produtos de degradação gerados. Após a incubação dos substratos com diferentes doses da metaloprotease, foi selecionada a dose de 10 µg para realizar a atividade

(dados não mostrados). Os substratos foram incubados com 10  $\mu$ g da BpirMP em diferentes tempos de reação. Na primeira hora de reação da metaloprotease com o substrato colágeno tipo IV (Fig. 14A) foi possível notar uma redução na intensidade da banda controle e o aparecimento de produtos de degradação quando comparado ao controle. Após á primeira hora, a cadeia  $\alpha$  desaparece e é possível notar o consumo da cadeia  $\beta$  do colágeno. Na sexta hora, a metaloprotease digeriu completamente as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do colágeno.

A metaloprotease hidrolisou a fibronectina rapidamente, degradando-a completamente após uma hora de incubação (Fig. 14B). A degradação da fibronectina pela metaloprotease foi mais intensa que a degradação do colágeno tipo IV.



Figura 14. Atividade proteolítica da metaloprotease sobre componentes da membrana basal. (A) Atividade proteolítica da metaloprotease BpirMP (10  $\mu$ g) sobre colágeno tipo IV. (B) Atividade proteolítica da metaloprotease BpirMP (10  $\mu$ g) sobre fibronectina. A metaloprotease foi incubada com os substratos por diferentes intervalos de tempo (30 min, 1, 3 e 6 h) a 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de 5  $\mu$ L de tampão de amostra e a atividade foi avaliada em SDS-PAGE 4-15 %. Linha 1: Padrão de massa Molecular; Linha 2: substrato controle; Linha 3: substrato + BpirMP (10  $\mu$ g) 30 min; Linha 4: substrato + BpirMP (10  $\mu$ g) 1 h; Linha 5: substrato + BpirMP (10  $\mu$ g) 3 h; Linha 6: substrato + BpirMP (10  $\mu$ g) 6 h.

#### 4.3.5.2. Atividade proteolítica sobre o Matrigel

A avaliação da capacidade da metaloprotease em degradar o matrigel foi realizada em gel gradiente de poliacrilamida para a visualização de produtos de degradação gerados. Após uma hora de incubação é possível visualizar produtos de degradação provavelmente devido à degradação da cadeia  $\alpha$  da laminina (~400 kDa) e do nidogênio (~100 kDa). No tempo de 6

horas, é possível visualizar o consumo quase completo das cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  da laminina e do nidogênio (Fig. 15).



**Figura 15.** Atividade proteolítica da metaloprotease BpirMP sobre matrigel. O substrato foi incubado com a metaloprotease BpirMP (15  $\mu$ g) por diferentes intervalos de tempo (1, 3 e 6 h) a 37 °C. Linha 1: padrão de massa molecular; Linha 2: controle – matrigel; Linha 3: matrigel + BpirMP (1 h); Linha 4: matrigel + BpirMP (3 h); Linha 5: matrigel + BpirMP (6 h); Linha 6: BpirMP (10  $\mu$ g).

A capacidade da metaloprotease BpirMP de hidrolisar os constituintes da MB foi comparada à atividade da metaloprotease BaP1 isolada da peçonha de *Bothrops asper* (Fig. 16). Os resultados apresentados sugerem que a BaP1 degrada o matrigel mais rapidamente do que a BpirMP, além de apresentarem padrões de fragmentação distintos (Fig. 16). As amostras incubadas com a metaloprotease BpirMP revelaram produtos de degradação com massa em torno de 40 e 60 kDa, diferentemente das amostras incubadas com a BaP1 no qual os fragmentos mais evidentes possuem massa aproximada de 15 e 60 kDa.



**Figura 16: Hidrólise do matrigel pelas metaloproteases BpirMP e BaP1.** Matrigel foi incubado a 37 °C com as metaloproteases BpirMP e BaP1 por 1 h e 3 h. As amostras foram separadas em gel gradiente de poliacrilamida 4-15%. Linha 1: Padrão de massa molecular; Linha 2: controle; Linha 3: Matrigel + BaP1 1 h; Linha 4: Matrigel + BpirMP 1 h; Linha 5: Matrigel + BaP1 3 h; Linha 6: Matrigel + BpirMP 3 h. As letras (a - f) representam as bandas selecionadas e recortadas para análise por espectrometria de massas.

Como o Matrigel é uma mistura complexa composta por diferentes proteínas que compõem a membrana basal, para identificar corretamente sobre quais proteínas da MB a BpirMP estaria atuando, alguns fragmentos gerados e visualizados por bandas no gel de eletroforese foram selecionados, recortados e analisados por espectrometria de massas. As bandas selecionadas estão indicadas por letras no gel da **figura 16**. Os resultados gerados pela análise por MALDI-TOF identificou fragmentos das cadeias  $\alpha \in \gamma$  da laminina e fragmentos de nidogênio, entretanto não foram identificados fragmentos de colágeno tipo IV. Os resultados dos fragmentos analisados estão listados na **tabela 2**.

Banda	Íon		Sequêncie	Família valaciona da/nuato(nac
	m/z	Z	Sequencia	Famma relacionada/protemas
a	1661.0	1	QDLGSPEGIALDHLGR	
	1351.9	1	ASLHGGEPTTIIR	
	1622.0	1	VVYWTDISEPSIGR	Nidogênio
	1922.2	1	TIFWTDSQLDRIEVAK	
	1678.0	1	QDLGSPEGIALDHLGR	
	1779.0	1	GNLYWTDWNRDNPK	
	1230.8	1	VLFDTGLVNPR	
	1381.8	1	TIFWTDSQLDR	
	1324.7	1	GNLYWTDWNR	
	2354.4	1	QQFSGIDEHGHLTISTELEGR	
	3569.1	1	VPQIPYGASVHIEPYTELYHYSSSVITSSSTR	
	2296.3	1	CYVVAQEGTFFEGSGYAALVK	Subunidade α da laminina
b	1123.7	1	LHFMFDLGK	
	1855.0	1	AFDLQGVFPHSCPGPEP	
	1183.7	1	VLFHVNNGAGR	
	1275.8	1	LYLGGLPSHYR	
	1020.7	1	WHTLQAHK	
	2354.4	1	QQFSGIDEHGHLTISTELEGR	Nidogênio
	3569.1	1	VPQIPYGASVHIEPYTELYHYSSSVITSSSTR	

\*Tabela-2. Identificação dos produtos de degradação do matrigel pela metaloprotease BpirMP.

Continua,

Continuação,

Banda	Íor	1	Sequência	Família relacionada/proteínas
	m/z	Z		
С	2615.5	1	HPISHAIDGTNNWWQSPSIQNGR	Subunidade α da laminina
	1321.9	1	QVFQVAYIIIK	
	1831.1	1	PSADDPSPQLLEFTSAR	
	1885.2	1	LVPLEHGEIHTSLINGR	
	1549.8	1	ADNEVICTSYYSK	
	1531.9	1	EYHWVTVTLDLR	
	1258.9	1	LVEHVPGRPVR	
	2164.2	1	FKPWQYYAVSDTECLTR	
d	1622.0	1	VVYWTDISEPSIGR	Nidogênio
	3031.8	1	IFVGSSQVPVVFENTDLHSYVVMNHGR	
	1351.9	1	ASLHGGEPTTIIR	
	2354.4	1	QQFSGIDEHGHLTISTELEGR	
	3569.1	1	VPQIPYGASVHIEPYTELYHYSSSVITSSSTR	
	1678.0	1	QDLGSPEGIALDHLGR	
	1285.7	1	NGFSITGGEFTR	
	1779.0	1	GNLYWTDWNRDNPK	
	1922.2	1	TIFWTDSQLDRIEVAK	
	1230.8	1	VLFDTGLVNPR	

Conclusão.

Banda	Íon		Compiler aire	Formália valo signa da /musto/mag
	m/z	Z	Sequencia	Famma relacionada/proteinas
e	3569.1	1	VPQIPYGASVHIEPYTELYHYSSSVITSSSTR	Nidogênio
	2354.4	1	QQFSGIDEHGHLTISTELEGR	
	2143.3	1	SSNAGHQGVWVFEIGSPATAK	
	1678.0	1	QDLGSPEGIALDHLGR	
	1779.0	1	GNLYWTDWNRDNPK	
	1230.8	1	VLFDTGLVNPR	
	1351.9	1	ASLHGGEPTTIIR	
	1102.6	1	NLYYTDWK	
f	1442.9	1	LSAEDLVLEGAGLR	
	2432.4	1	LHEATDYPWRPALSPFEFQK	Subunidade γ da laminina
	1568.9	1	SYYYAISDFAVGGR	

\*Os produtos de degradação visualizados por SDS-PAGE foram selecionados, recortados e submetidos à digestão enzimática com tripsina e identificados por espectrometria de massas por MALDI-TOF/TOF.
Como a metaloprotease foi capaz de degradar colágeno tipo IV isolado e visualizado na **figura 14A**, mas fragmentos de colágeno não foram detectados nas amostras recortadas no gel de eletroforese e analisadas por MALDI-TOF, a análise da hidrólise do matrigel foi realizada também por Western Blot (**Fig. 17**). Produtos de degradação das cadeias de laminina e nidogênio foram detectados (**Fig. 17A e B**) confirmando os resultados descritos acima. Além dos produtos gerados pela hidrólise da laminina e nidogênio, fragmentos de colágeno tipo IV também foram detectados por WB (**Fig. 17C**).





**Figura 17. Hidrólise dos componentes da membrana basal** *in vitro* pela metaloprotease **BpirMP isolada da peçonha da serpente** *Bothrops pirajai* analisados por Western Blot. Hidrólise da laminina (A), nidogênio (B) e colágeno tipo IV (C) analisados por Western Blot. Linha 1: controle; Linha 2: Matrigel + BpirMP 30 minutos; Linha 3: Matrigel + BpirMP 1 h; Linha 4: Matrigel + BpirMP 3 h; Linha 5: Padrão de massa molecular.

A atividade proteolítica da BpirMP sobre matrigel foi comparada à atividade proteolítica da metaloprotease BaP1 por Western Blot. A BaP1 hidrolisou preferencialmente as cadeias de laminina (Fig. 18 A) e colágeno tipo IV (Fig. 18 C) consumindo os substratos já na primeira hora enquanto que, o efeito induzido pela BpirMP foi mais lento e menos intenso que o efeito induzido pela BaP1 tanto para laminina como para o colágeno tipo IV (Fig. 18A e C).

Na análise da degradação da laminina por WB, duas bandas são evidentes na amostra controle (200 e 300 kDa). Ambas as toxinas BpirMP e BaP1 hidrolisaram as cadeias de laminina gerando fragmentos em torno de 70 e 100 kDa, entretanto a metaloprotease BaP1 hidrolisa as cadeias da laminina mais rapidamente que a BpirMP, além de causar uma redução mais proeminente das bandas de 200 e 300 kDa no tempo de 3 h.

WB de matrigel com anticorpos anti-colágeno tipo IV revelou duas bandas evidentes no controle de 170 e 250 kDa. Ambas as toxinas degradaram o colágeno tipo IV gerando produtos de degradação na faixa de 70kDa. A degradação da banda de 250 kDa pela metaloprotease BaP1 é evidente já na primeira hora de incubação, enquanto que a degradação pela toxina BpirMP é mais lenta comparada à BaP1. Além disso, é possível perceber um fragmento com massa aproximada de 80 kDa na incubação com a BaP1 que não é visualizado na incubação do matrigel com a BpirMP (**Fig. 18 A e C**).

A análise imunoquímica do matrigel demonstrou uma rápida degradação do nidogênio (150 kDa) já na primeira hora de incubação com as duas toxinas (Fig. 18B). A incubação das amostras de matrigel com BpirMP apresentou produtos de degradação com massas de aproximadamente 45 e 55 kDa, enquanto que a incubação das amostras de matrigel com BaP1 revelou fragmentos com 40, 55 e 70 kDa. Além disso, é possível visualizar o consumo total da banda controle de 150 kDa do nidogênio pela BaP1 no tempo de incubação de 3 h.





**Figura 18.** Análise por Western Blot da hidrólise do Matrigel pelas metaloproteases **BpirMP e BaP1**. Matrigel foi incubado com as metaloproteases BpirMP e BaP1 (10 μg) por diferentes tempo. Após a reação, o anticorpo anti-laminina (A), anti-nidogênio (B) e anticolágeno (C) foram utilizados. Linha 1: Padrão de Massa molecular, Linha 2: Matrigel controle, Linha 3: Matrigel + BpirMP 1 h, Linha 4: Matrigel + BaP1 1 h, Linha 5: Matrigel + BpirMP 3 h, Linha 6: Matrigel + BaP1 3 h.

### 4.3.6. Atividade proteolítica sobre componentes da membrana basal in vivo

A ação *in vivo* da metaloprotease BpirMP sobre os componentes da membrana basal foi avaliada por WB e comparada à atividade *in vivo* da BaP1. Ambas as metaloproteases atuaram sobre os componentes da membrana basal *in vivo* como demonstrado na **figura 19**. Tanto a BaP1 como a BpirMP degradaram rapidamente o nidogênio (**Fig. 19B**). Produtos de

degradação na faixa 50 kDa podem ser visualizados para ambas as toxinas. A ação *in vivo* das metaloproteases variaram em relação a intensidade e padrão de hidrólise da laminina (Fig. 19A). Tanto a BpirMP como a BaP1 degradaram a laminina, entretanto a ação da BaP1 foi mais intensa, com o aparecimento de um produto de degradação em torno de 250 kDa para a BaP1 após 15 minutos da injeção da toxina enquanto que para a BpirMP essa mesma banda só foi visualizada após 1 hora da injeção da toxina. Além disso, a análise por WB dos tecidos injetados com a BaP1 revelou fragmentos na faixa de 50 kDa que não foram visualizados para a BpirMP.



Figura 19. Hidrólise de componentes da membrana basal *in vivo* pelas metaloproteases BpirMP e BaP1. (A) Laminina e (B) Nidogênio. Linha 1: Padrão de massa molecular, Linha 2: controle, Linha 3: Homogenato de tecido muscular + BpirMP 15 minutos, Linha 4: Homogenato de tecido muscular + BaP1 15 minutos, Linha 5: Homogenato de tecido muscular + BpirMP 1 h, Linha 6: Homogenato de tecido muscular + BaP1 1 h.

# 4.3.7. Análise histopatológica

A possível toxicidade local e sistêmica da BpirMP foi avaliada por análises histopatológicas de diferentes tecidos: renal, pulmonar, cardíaco, esplênico e muscular (Fig. 20), demonstrando alterações morfológicas nos diferentes órgãos testados. Os animais que receberam injeção (i.m.) da BpirMP (50 μg) no músculo gastrocnêmio (Fig. 20B) demonstraram infiltrados inflamatórios focais (com neutrofilia), degeneração das fibras musculares e hemorragia. Observou-se também congestão alveolar e infiltrado leucocitário difuso no tecido pulmonar (Fig. 20D). A BpirMP induziu necrose dos túbulos renais com

formação de debris celulares e hiperemia (**Fig. 20F**), e no figado causou necrose evidenciada pela alteração morfológica das células e a formação de núcleos picnóticos dos hepatócitos, infiltrado leucocitário e célula gigante (**Fig. 20H**). No músculo cardíaco (**Fig. 20J**) é possível observar degeneração hialina (DI) e gordurosa (G).





Figura 20: Análise histopatológica após injeção da metaloprotease BpirMP isolada da peçonha de *B. pirajai*. (A) Lâminas obtidas de amostras de músculo gastrocnêmio injetado com PBS; (B) Músculo gastrocnêmio injetado com BpirMP; (C) Pulmão de animal injetado com PBS; (D) Pulmão de animal injetado com BpirMP; (E) Rim de animal injetado com PBS, normal; (F) Rim de animal injetado com BpirMP; (G) Fígado de animal injetado com PBS, normal; (H) Fígado de animal injetado com BpirMP; (I) Músculo cardíaco injetado com PBS, aspecto normal das fibras musculares cardíacas; (J) Músculo cardíaco injetado com BpirMP. N: necrose, L: infiltrado leucocitário, HI: hiperemia, DI: degeneração hialina e H: hemorragia.

Os experimentos realizados no Instituto Clodomiro Picado tinham como objetivo caracterizar o efeito agudo da toxina BpirMP sobre o músculo gastrocnêmio de animais. Os experimentos mostraram que a injeção de 50 µg da BpirMP no músculo gastrocnêmio de camundongos induziu alterações morfológicas evidenciadas pela presença de algumas células necróticas e hemorragia (Fig. 21C e D), diferente do controle injetado com PBS (Fig. 21A) no qual as células apresentaram aspecto morfológico normal.



**Figura 21.** Análise histopatológica após injeção da metaloprotease BpirMP isolada da peçonha de *B. pirajai*. Lâminas obtidas de amostras de músculo gastrocnêmio direito de camundongos, 1 h após injeção com PBS, peçonha bruta ou com a BpirMP (50 μg). (A) Músculo gastrocnêmio injetado com PBS. (B) Músculo gastrocnêmio injetado com peçonha bruta de *B. pirajai* (50 μg). (C) e (D) Músculo gastrocnêmio injetado com 50 μg da BpirMP. (E) e (F) Músculo gastrocnêmio injetado com 100 μg da BpirMP. As letras H e N indicam hemorragia e necrose respectivamente.

# 4.3.8. Atividade miotóxica

Adicionalmente à análise histopatológica, a atividade miotóxica da toxina BpirMP foi avaliada pelos nivéis de CK no plasma sanguíneo de camundongos (Fig. 22). Os níveis de CK se mostraram ligeiramente elevados na primeira hora após a injeção da toxina, diminuindo na terceira hora e retornando aos níveis basais depois de 24 h quando comparado ao grupo controle, que recebeu apenas PBS.



Figura 22. Atividade miotóxica da metaloprotease BpirMP isolada da peçonha de *B. pirajai*. Dosagem dos níveis de creatina cinase (CK) plasmática após a injeção intramuscular de BpirMP (50  $\mu$ g) e ou peçonha bruta de *B. pirajai* (PB) (50  $\mu$ g) no múculo gastrocnêmio direito de camundongos. Os resultados são expressos pela média ± S.D (n = 3). \* Resultados significativamente diferentes quando comparados ao controle negativo (PBS) (p < 0,05).

### 4.3.9. Atividade hemorrágica

A metaloprotease BpirMP apresentou baixa atividade hemorrágica, sendo necessária uma dose de 50  $\mu$ g para a indução de um halo de 10 mm (Fig. 23 B) enquanto que 15  $\mu$ g da peçonha bruta (Fig. 23 A) induziu a formação de um halo hemorrágico de 2,0 mm no dorso do camundongo.



**Figura 23.** Atividade hemorrágica da metaloprotease isolada da peçonha de *B. pirajai.* (A) Peçonha bruta de *B. pirajai* 15 µg. (B) BpirMP 50 µg. As amostras foram injetadas intradérmicamente (i.d) na região dorsal dos camundongos e após 3 h, os animais foram eutanasiados e a pele retirada para a medição do halo hemorrágico formado.

# 4.3.10. Efeitos pró-inflamatórios

# 4.3.10.1. Atividade edematogênica

A injeção intraplantar de BpirMP induziu uma resposta dose-tempo dependente na formação do edema (Fig. 24). A BpirMP induziu edema na pata de ratos rapidamente, com pico máximo de resposta 2 h após a injeção da toxina. A dose que apresentou melhor resposta foi a de 50 µg, sendo portanto selecionada para a avaliação dos mediadores inflamatórios.



Figura 24. Avaliação dose tempo-resposta do edema induzido pela metaloprotease BpirMP. O aumento do volume da pata foi determinado sobre a pata posterior de ratos antes e em diferentes tempos após a injeção intraplantar de salina (grupo controle) ou da toxina (50  $\mu$ g/pata). Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  S.D. (n = 5). \* Valores estatisticamente significativos quando comparados entre si (p < 0,05).

Para a avaliação dos mediadores envolvidos no processo inflamatório induzido pela BpirMP, foram utilizados diferentes inibidores e antagonistas da cascata inflamatória (Fig. 25). Nos ratos pré-tratados com meloxicam, valeril salicilato, cromoglicato de sódio, pirilamina e tioperamida observou-se uma redução significativa no edema induzido pela toxina BpirMP na maioria dos tempos observados, enquanto que os outros medicamentos apresentaram redução do edema apenas no pico da resposta edematogênica.

O pré-tratamento dos animais com o medicamento L-NMMA (Fig. 25A), apresentou redução do edema apenas no pico da resposta edematogênica. Assim como o óxido nítrico, a bradicinina parece não apresentar um papel majoritário na resposta edematogênica induzida pela metaloprotease BpirMP, pois o pré-tratamento dos animais com HOE-140 (Fig. 25B), antagonista seletivo de receptores B2, reduziu o edema apenas no pico da resposta.





Figura 25. Avaliação dos mediadores envolvidos na resposta edematogênica induzida pela toxina BpirMP. O aumento do volume da pata foi determinado sobre a pata posterior de ratos antes e em diferentes tempos após a injeção intraplantar da salina ou da toxina (50  $\mu$ g/pata). O edema foi expresso em porcentagem do aumento do volume da pata em relação ao volume inicial da pata do animal. Diferentes medicamentos foram utilizados na avaliação dos mediadores inflamatórios: L-NMMA (A), HOE 140 (B), dexametasona (C), ácido nordiidroguaiarético - NDGA (D), meloxicam (E), valeril salicilato (F), cromoglicato de sódio (G), cimetidina (H), pirilamina (I), tioperamida (J). Os resultados foram expressos pela média ±S.D. (n = 4). \* Valores estatisticamente significativos quando comparados com o grupo controle BpirMP 50  $\mu$ g/pata (P < 0,05).

# 4.3.10.2. Hiperalgesia

A metaloprotease BpirMP causou uma redução significativa do limiar nociceptivo dos animais testados, apresentando pico de resposta três horas após a injeção da toxina (Fig. 26).



Figura 26. Avaliação dose tempo-resposta da hiperalgesia induzida pela metaloprotease BpirMP. A hiperalgesia foi determinada sobre a pata posterior de ratos antes e em diferentes tempos após a injeção intraplantar de salina (pata controle) ou da toxina (50 µg/pata). Sensibilidade à dor foi apresentada como a diminuição do limiar nociceptivo e expresso em porcentagem. Cada ponto representa a média  $\pm$  S.D. \*Valores estatisticamente significativos quando comparados entre si (p < 0,05).

Inibidores específicos ou antagonistas de receptores foram utilizados para avaliar o papel dos mediadores envolvidos na hiperalgesia induzida pela BpirMP. O tratamento dos animais com Dexametasona (Fig. 27C) reduziu a hiperalgesia na maioria dos tempos avaliados. O pré-tratamento com ácido nordiidroguaiarético (NDGA), meloxicam, cromoglicato de sódio, Cimetidina e pirilamina (Figs. 27D, E, G, I e J, respectivamente) reduziram a hiperalgesia induzida pela BpirMP no pico da resposta hiperalgésica. O pré-tratamento com os outros antagonistas não apresentaram influência sobre a hiperalgesia.





Figura 27. Avaliação dos mediadores inflamatórios envolvidos na hiperalgesia induzida pela metaloprotease BpirMP. Grupo de animais (n = 4) foram pré-tratados com diferentes classes de medicamentos em intervalos de tempos apropriados simultaneamente, ou antes, da injeção da BpirMP (50  $\mu$ g / pata). Diferentes medicamentos foram utilizados na avaliação dos mediadores inflamatórios: L-NMMA (A), HOE 140 (B), dexametasona (C), NDGA (D), meloxicam (E), valeril salicilato (F), cromoglicato de sódio (G), tioperamida (H), cimetidina (I), pirilamina (J). Os resultados foram calculados como a diferença entre ambas as patas e expresso em porcentagem como o decréscimo do limiar nociceptivo em relação ao limite inicial. \* Valores estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle (BpirMP 50 $\mu$ g/pata) (p < 0,05).

# 4.3.10.3. Exsudato inflamatório

A avaliação dos exsudatos inflamatórios peritoneais, induzidos 6 ou 24 h após a administração de diferentes doses da metaloprotease BpirMP, mostrou que a enzima promoveu aumentos na quantidade de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos em todas as doses avaliadas (25; 50 e 100 µg) (Fig. 28). Entretanto, as doses não apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre elas no tempo de 6 h.

Além disso, a diferenciação dos leucócitos presentes nestes exsudatos em neutrófilos ou células mononucleares (linfócitos ou monócitos) revelou que 6 h após a administração da BpirMP ocorreu aumentos significativos no número de neutrófilos em relação ao controle negativo (**Fig. 29**). Na maior dose avaliada (100 µg) o número de leucócitos chegou a 90%. Depois de 24 h, a quantidade de neutrófilos permaneceu significativamente mais elevada em relação ao controle negativo para todas as doses avaliadas, principalmente na dose de 100 µg.



Figura 28. Contagem total dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após 6 e 24 horas da administração da metaloprotease de *B. pirajai*. A contagem do número total de leucócitos presentes no lavado peritoneal após injeção de PBS (controle negativo) ou diferentes doses da enzima (25, 50 e 100  $\mu$ g em 500  $\mu$ L de PBS) foi feita em câmara de Neubauer. Resultados expressos pela média  $\pm$  SD (n=3). \*Valores significativamente estatísticos quando comparado ao grupo controle negativo (p<0,05).



Figura 29. Contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após 6 e 24 horas da administração da metaloprotease de *B. pirajai*. A contagem diferencial (neutrófilos e células mononucleares) dos leucócitos do exsudato inflamatório induzido por PBS (controle negativo) ou diferentes doses da enzima (25, 50 e 100  $\mu$ g) foi feita em microscópio óptico, magnificação 400x. Resultados expressos pela porcentagem média de cada tipo celular ± SD (n=3). \* Valores significativos em relação ao controle negativo (p<0,05).

### 4.4. Caracterização estrutural

### 4.4.1. Determinação da estrutura primária da metaloprotease

A sequência de aminoácidos da metaloprotease BpirMP foi parcialmente determinada por espectrometria de massas pela sobreposição dos peptídeos gerados a partir da digestão da metaloprotease pelas enzimas tripsina, quimiotipsina e v8 (*S. aureus*) (Fig. 30). Com a união dos fragmentos obtidos da degradação da BpirMP foi possível determinar parte da sequência de aminoácidos da metaloprotease obtendo-se 187 resíduos de aminoácidos. Além disso, o sequenciamento parcial da metaloprotease permitiu identificar o domínio metaloprotease, o sítio ligante de zinco HELGHNLGMEHD altamente conservado, o *Met-turn* correspondente à sequência CVM, adjacente ao sítio catalítico, além de cinco resíduos de cisteína nas posições 118, 159, 161, 166 e 198.



**Figura 30. Sequência parcial de aminoácidos da metaloprotease BpirMP.** A sequência de aminoácidos da metaloprotease foi determinada por espectrometria de massas pela sobreposição dos peptídeos gerados a partir da digestão da metaloprotease pelas enzimas tripsina (T), quimiotripsina (Qui) e *S. Aureus* (V8). Os peptídeos gerados da degradação da metaloprotease foram analisados em espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF. Os dados gerados por MS foram submetidos aos bancos de dados NCBI e Swiss-Prot utilizando os sites BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) e MASCOT (http://www.matrixscience.com/search\_form\_select.html) na tentativa de identificar sequências de proteínas homólogas para fins comparativos.

# 4.4.2. Alinhamento múltiplo

O alinhamento múltiplo da sequência da BpirMP com outras sequências de metaloproteases da classe P-I, depositadas no banco de dados Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih. gov/), foi realizado utilizando o programa ClustalX v.2.0.11 (Fig. 31). De acordo com o número de aminoácidos totalmente conservados (\*) presentes, pode-se dizer que a sequência parcial da metaloprotease BpirMP apresenta alta identidade com outras metaloproteases isoladas de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* como: BjussuMP-II 90%, BmooMP- $\alpha$  88%, leucurolisina-A 79%, BaP1 79% e neuwiedase 70% e também exibindo varias substituições conservativas.

### Identidade (%)

BpirMP	SP-TYIEVAVVADHRMFKKYNSNLNTIRKWVHEMVNSMNGVYRSMDVHASLANLE	
BjussuMP-II	-QQKFSP-RYIEVAVVADHRMFKKYNSNLNTIRKWVHEMVNSMNGVYRSMDVHLSLANLE	90
BmooMP-alpha	RFSP-RHIELVVVADHGMFKKYNSNLNTIRKWVHEMVNSMNGFYRSVDVTASLANLE	88
Bapl	${\tt ERFSP-RYIELAVVADHGIFTKYNSNLNTIRTRVHEMLNTVNGFYRSVDVHAPLANLE}$	79
leucurolisina-A	-QQFSP-RYIELVVVADHGMFKKYNSNLNTIRKWVHEMLNTVNGFFRSMNVDASLVNLE	79
neuwiedase	- QQRFFP QRYIELVIVADRRMYTKYNSDSNKIRTRVHELVNTVNGFFRSMNVDASLANLE	70
	:* * :**:.:***: ::.***: *.**. *.**::*::*::**.:**::*	
BpirMP	$\texttt{VWSKKDLINVQKDSRETLKSFGEWRERDLLPRISHDNAQLLTAIVFDQQTIGRAYIGGM}{\textbf{C}}$	
BjussuMP-II	$\texttt{VWSKKDLINVQKDSRETLKSFGEWRERDLLPRISHDNAQLLTAVVFDQQTIGRAYIAGM}{\textbf{C}}$	
BmooMP-alpha	VWSKKDLINVQKDSRETLKSFGEWRERDLLPRISHDNAQLLTTIVFDGHVIGRAFTGGMC	
Bapl	VWSKQDLIKVQKDSSKTLKSFGEWRERDLLPRISHDHAQLLTAVVFDGNTIGRAYTGGMC	
leucurolisina-A	VWSKKDLIKVEKDSSKTLTSFGEWRERDLLPRISHDHAQLLTVIFLDEETIGIAYTAGMCC	
neuwiedase	VWSKKDLIKVEKDSSKTLTSFGEWRERDLLRRKSHDNAQLLTAIDFNGNTIGRAYLGSMC	
	****:***:*:*** :**.********** * ***:*****: ::** *:**	
BpirMP	DPRQSVGVVMDHSKINLQVAVTMAHELGHNLGMEHDENQ <mark>C</mark> HCDAPS <mark>CVM</mark> ADVL	
BjussuMP-II	DPRHSVGVVMDHSKENLQVAVTMAHELGHNLGMEHDENQ <mark>C</mark> H <mark>C</mark> DAPS <mark>CVM</mark> ASVLSVVLSYE	
BmooMP-alpha	DPRHSVGVVMDHSPKNLQVAVTMAHELGHNLGMHHDGNQ <mark>C</mark> HCDAAS <mark>CIM</mark> ADSLSQVLSYE	
Bap1	DPRHSVGVVRDHSKNNLWVAVTMAHELGHNLGIHHDTGS <mark>C</mark> SCGAKSCIMASVLSKVLSYE	
leucurolisina-A	DLSQSVAVVMDHSKKNLRVAVTMA <mark>HELGHNLGMRH</mark> DGNQ <mark>C</mark> H <mark>C</mark> NAPS <mark>CIM</mark> ADTLSKGLSFE	
neuwiedase	NPKRSVGIVQDHSPINLLVGVTMA <mark>HELGHNLGMEH</mark> DGKD <mark>C</mark> L <mark>C</mark> GASL <mark>CIM</mark> SPGLTDGPSYE	
	: :**.:* *** ** *.*********************	
BpirMP	TKHNPQ <mark>C</mark> ILNEPL	
BjussuMP-II	FSD <mark>C</mark> SQNQYQTYLTKHNPQ <mark>C</mark> ILNKPL	
BmooMP-alpha	FSD <mark>C</mark> SQNQYQTYLTKHNPQ <mark>C</mark> ILNEPL	
Bapl	FSD <mark>C</mark> SQNQYETYLTNHNPQ <mark>C</mark> ILNKP-	
leucurolisina-A	FSD <mark>C</mark> SQNQYQTYLTKHNPQ <mark>C</mark> ILNKP-	
neuwiedase	FSD <mark>C</mark> SKDYYQTFLTNHNPQ	
	* • * * *	

**Figura 31.** Alinhamento múltiplo da sequência parcial de aminoácidos da metaloprotease BpirMP com sequências de outras metaloproteases da classe P-I de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. Os resíduos de aminoácidos em destaque fazem parte de pontes dissulfeto (verde), do sítio catalítico (cinza) e *Met-turn* (azul). O alinhamento múltiplo das sequências foi feito pelo programa ClustalX v. 2.0.11. (\*) indica posição com resíduo de aminoácido totalmente conservado; (:) indica conservação de um dos seguintes grupos com alto score: K/R/Q/H, S/A, K/N/D, F/L/V/I, E/D/N/Q, T/S/A, I/M/L; (.) indica conservação de um dos seguintes grupos de menor score: N/R/G, G/D/N, A/V/T, Q/K/E/R, S/K/G/A, D/K/H, C/S, T/P. BmooMP-α de *Bothrops moojeni* (gi:229462813), BjussuMP-II de *Bothrops jararacussu* (gi: 82208218), neuwiedase de *Bothrops neuwiedi* (gi: 6760464), BaP1 de *Bothrops asper* (gi: 38492529), leucurolisina de *Bothrops leucurus* (gi: 114149951).

## 4.4.3. Modelagem teórica da BpirMP

O modelo teórico da estrutura tridimensional da molécula foi construído utilizando ferramentas computacionais uma vez que não foi possível obter o cristal da toxina (dados não mostrados).

A molécula da metaloprotease BmooMP-α foi selecionada como template para a construção do modelo da BpirMP devido ao alto grau de identidade entre as sequências (88%).

A BpirMP possui uma fenda formada pelo sítio ativo que separa a estrutura em dois subdomínios: um subdomínio principal com estruturas secundárias características compreendendo quatro  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ 1,  $\alpha$  2,  $\alpha$  3 e  $\alpha$  4) e seis folhas  $\beta$  ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5 e  $\beta$ 6), todas paralelas exceto a fita V que é antiparalela (**Fig. 32**). O subdomínio menor é formado por uma  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$  5) e vários loops. A molécula provavelmente possui três pontes dissulfeto (Cys116-Cys196, Cys 156-Cys180, Cys158-Cys163) que estabilizam a estrutura (**Fig. 33**). As duas primeiras pontes dissulfeto ligam os dois subdomínios, enquanto que a terceira ocorre dentro do subdomínio menor. Tanto o N quanto o C terminal da BpirMP estão localizados sobre a superfície da molécula, como nas outras enzimas estudadas, e a  $\alpha$ -hélice do C-terminal (hélice 5) é estabilizada pela ponte dissulfeto Cys158-Cys163.

O sítio ativo (Fig. 34) é apresentado tal como descrito para outras SVMPs da classe P-I cujas estruturas foram estudadas, sendo que o íon zinco é coordenado pelos átomos de nitrogênio nos resíduos de Histidina 141, 145, e 151. Os resíduos de histidina 141 e 145 estão localizados na  $\alpha$ -hélice 4. O Met-turn, por sua vez, permite que o resíduo de Histidina 151 fique próximo ao íon zinco do sítio catalítico, e a cadeia lateral do resíduo de metionina 165 forma uma base hidrofóbica para o sítio ativo. A presença de um íon de cálcio (Fig. 32) localizado na superfície foi relatada para várias SVMPs e é considerado importante para a estabilização estrutural (GOMIS-RUTH et al., 1994).

As propriedades estereoquímicas do modelo gerado para a metaloprotease BpirMP foram avaliadas pelo programa PROCHECK revelando um G-factor de 0,04 condizente com os valores obtidos experimentalmente para outros modelos descritos. O gráfico de Ramachandran (Fig. 35) mostra que 100% dos resíduos de aminoácidos do modelo encontram-se nas regiões estereoquimicamente permitidas.



Figura 32. Representação em cartoon do modelo teórico da metaloprotease BpirMP. Representação destacando os elementos de estrutura secundária  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4 e  $\alpha$ 5) e fitas  $\beta$  ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5 e  $\beta$ 6), o cofator Zn<sup>2+</sup> (esfera cinza) e o cofator Ca<sup>+</sup> (esfera verde). Ilustração gerada pelo programa PyMOL v.0.99.



**Figura 33. Representação em cartoon das pontes dissulfeto da estrutura da metaloprotease BpirMP.** Em rosa (pink) estão representados os resíduos de cisteína e as prováveis pontes dissulfeto formadas. Ilustração gerada pelo programa PyMOL v. 0.99.



Figura 34. Coordenação do cofator  $Zn^{2+}$  (esfera verde) do sítio catalítico da metaloprotease BpirMP. Os resíduos de aminoácidos das histidinas do sítio catalítico (His141, His145 e His151) estão representados em *sticks*, e a interação está demonstrada por linhas tracejadas em preto. Ilustração gerada pelo programa PyMOL v. 0.99.



Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

**Figura 35. Análise do modelo estrutural da metaloprotease BpirMP.** O gráfico de Ramachandran apresenta 100% dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis. A análise do modelo e o gráfico foram gerados pelo programa PROCHECK v.3.5.4.

# 4.5. Análise proteômica da peçonha de Bothrops pirajai

Inicialmente 2,5 mg de peçonha da espécie *B. pirajai* foram fracionados por HPLC de fase reversa resultando em 29 frações (**Fig. 36**). Após a coleta das frações, estas foram recolhidas e secas em centrifuga a vácuo, para posterior caracterização em gel SDS-PAGE e MALDI-TOF/TOF. A figura 36 apresenta o perfil cromatográfico gerado e suas respectivas frações coletadas.



**Figura 36. Fracionamento da peçonha bruta de** *B. pirajai* **por RP-HPLC.** Dois miligramas da peçonha bruta foram fracionados em HPLC de fase reversa. As frações foram coletadas manualmente e caracterizadas por digestão "in-gel" com tripsina e Mass Fingerprint.

A análise das frações em gel SDS-PAGE 15% demonstrou alto conteúdo de proteínas com alta massa molecular entre 40 e 70 kDa e proteínas de baixa massa molecular em torno de 15 kDa. Proteínas com massa molecular entre 20 e 40 kDa também foram identificadas porém em menor quantidade (Fig. 37). O padrão de bandas observado sugere um alto conteúdo de metaloproteases e também de fosfolipases A<sub>2</sub>. As bandas de interesse foram recortadas dos géis, submetidas à redução e alquilação com DTT e iodoacetoamida, respectivamente, seguido por digestão in-gel com tripsina. Os peptídeos resultantes da digestão foram analisados por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF. Os resultados estão apresentados na tabela 3.



Figura 37. SDS-PAGE das frações resultantes do fracionamento da peçonha de *B. pirajai* em RP-HPLC. As linhas numeradas de 10 a 29 representam as frações coletas durante o fracionamento da peçonha bruta de *B. pirajai* (Fig. 36).

As frações 1 a 09 não foram visualizadas no gel SDS-PAGE possivelmente por corresponderem a peptídeos. Os componentes da peçonha de *B. pirajai* estão distribuídos em seis famílias principais de proteínas: metaloproteases, fosfolipases A<sub>2</sub>, serinoproteases, L-aminoácido oxidases, desintegrinas e lectinas do tipo-C. Também foi possível identificar a predominância de algumas destas familias que compõem a peçonha, sendo que cerca de 40% da peçonha é composta por fosfolipases A<sub>2</sub>, seguido pela família das metaloproteases (20%). A caracterização da peçonha ainda demonstrou uma quantidade elevada de lectinas do tipo-C, sendo superior à quantidade de L-AAOs e serinoproteases. A figura 38 ilustra a composição e a distribuição das famílias de proteínas na peçonha.



**Figura 38.** Resumos da composição de proteínas da peçonha de *Bothrops pirajai*. As abundâncias relativas foram calculadas com base nas áreas dos picos. PLA<sub>2</sub>: fosfolipase-A<sub>2</sub>; SP, serinoproteinases; LAAO: L-aminoácido oxidase; SVMP: metaloprotease, DIS: desintegrina, CLT: Lectina tipo-C, PEP: peptídeos, UNK: desconhecido.

Tabela-3: Perfil das frações da peçonha de *Bothrops pirajai* isoladas por RP-HPLC e identificação das famílias de proteínas por MALDI-TOF/TOF.

Pico %	Massa	Peptíd	eo	MS/MS-sequência derivada	Família; ~ proteína relacionada *														
		(kDa)	m/z	Z															
1-4	-	-	-	-	Não identificado	-													
5	0.9	-	444.2	1	ZBW	SVMP peptídeo													
6	4.7	-	444.2	1	ZBW	SVMP peptídeo													
7-9	-	-	-	-	Não identificado	-													
10	1.4	12.4	2051.2	1	LRPGAQCAEGLCCDQCR	Desintegrina; ~ P18618													
11	0.4	-	-	-	Não identificado	-													
																1092.9	1	YHLKPFCK	
		-	1346.1	1	MILQETGKNPAK														
12a	25.3	13.6	1534.1	1	SYGAYGCNCGVLGR	$ Fosfolipase A_2 K49; \sim Q9IAT9$													
		-	1405.1	1	TIVCGENNPCLK														
12b	3.4	11.6	1534.8	1	SYGAYGCNCGVLGR	Fosfolipase $A_2$ K49; ~ Q9IAT9													
13	0.8	13.6	1533.6	1	SYGAYGCNCGVLGR	Fosfolipase A <sub>2</sub> K49; ~ Q9IAT9													
14a	1.0	29.8	-		Não identificado	-													
14b	0.2	21.6	-		Não identificado														
14.	14c 0.6	12.4	1573.7	1	EFCVELVSLTGYR	Lecting ting C: D22510													
14C		0.0	13.4 -	1241.5	1	DFSWEWTDR	Lecuna upo C; ~ P83519												
15-16a	3.6	21.9	1905.1	1	KPEIQNEIVDLHNSLR	CRISP; ~ Q8JI40													
Continua,																			

Continuação,

Pico %	Massa	Peptíd	eo	MS/MS-sequência derivada	Família; ~ proteína relacionada *		
	(kDa)	m/z	Z	_			
1 5 1 61	2.0	10.0	1571.8	1	EFCVELVSDTGYR		
15-16b	15-16b 3.9	13.2 -	3277.7	1	YKPGCHLASIHLYGESPEIAEYISDYHK	Lectina tipo C; ~ Q6QX33	
			2601.3	1	LPFPYYTTYGCYCGWGGQGQPK		
	4.0	13.2	3015.5	1	ETGKLPFPYYTTYGCYCGWGGQGQPK	Fosfolipase A <sub>2</sub> , D49; ~P86974	
		-	1394.7	1	DLWQFGQMILK	-	
			1572.1	1	EFCVELVSDTGYR	-	
		-	1240.4	1	DFSWEWTDR	-	
17	17 4.4	4.4	13.4	1039.5	1	NAFLCQCK	Lectina tipo C; ~ Q6QX33
			1277.4	1	LWNDQVCESK		
	18a 3.5		1504.6	1	SVANDDEVIRYPK		
18a		3.5	48.8	971.8	1	IYLGIHTR	Serinoprotease; ~ P81661
		-	1116.7	1	SVANDDEVIR	<b>1</b>	
18b	2.1	27.4	2476.5	1	VSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSVCR	Serinoprotease; ~ Q91516	
			3892.2	1	MINYVMGESGVLQYLSYGCYCGLGGQGQPTDA		
	19-20 6.7	-	1505.3	1	TDR		
10.00		6 -	-	934.3	1	CCFVHDCCYGK	
19-20 6.7		13.0 865.3 1 YV	YWFYGAK	Fostolipase $A_2$ , D49; ~ Q8AXY1			
		-	854.3	1	SLWQFGK	-	
		-	1111.4	1	VATTCFRDNKDTYDIK	-	
21	0.6	33.3	1718.2	1	KKDDVLDKDIMLIR	Serinoprotease; ~ P81824	

Continuação,

Pico %		Massa	Peptíd	eo	MS/MS-sequência derivada	Família; ~ proteína relacionada *
		(kDa)	m/z	Z		
22	0.3	-	-	-	Não identificado	-
			1522.4	1	ADDRNPLEECFR	
		-	2327.4	1	VGEVNKDPGVLDYPVKPSEVGK	
			3066.0	1	YAMGGITTFTPYQFQHFSEALTAPVDR	
23a	2.1	54.9	1389.6	1	KFWEDDGIHGGK	L-aminoácido oxidase; ~ Q6TGQ9
		_	1487.7	1	ETDYEEFLEIAK	
		_	1293.7	1	EGWYANLGPMR	
		-	1746.0	1	QFQHFSEALTAPVDR	
			2702.4	1	IVSPPVCGNELLEKGEECDCGSPR	
23b	23b 1.6	43.1	1803.9	1	YFVEVGEECDCGSPR	Metaloprotease; ~ Q0NZX9
		-	1821.8	1	PGEQCAEGLCCDQCR	
			2294.2	1	TNPDVPHCANINLLDDAVCR	
23c	0.6	23.8	1279.7	1	AAYPELPAEYR	Serinoprotease; ~ Q5W959
		-	2889.7	1	LDSPVSNSEHIAPLSLPSSPPSVGSVCR	
24a	0.6	135.9	-	-	Não identificado	-
24b	4.0	50.0	-	-	Não identificado	-
			1746.0	1	QFQHFSEALTAPVDR	
25a	3.1	65.0	1293.7	1	EGWYANLGPMR	L-aminoácido oxidase; ~ Q6TGQ9
		-	2340.3	1	ISHDNAQLLTAVVFDQQTIGR	

<b>O</b>	~
1 Onc	111630
	iusav.

Pico %		Massa	Massa Peptídeo		MS/MS-sequência derivada	Família; ~ proteína relacionada *	
		(kDa)	m/z	Z			
25h	251 12.2	22.0	1094.6	1	YNSNLNTIR	Matalogrational 07T1T4	
230	13.3	22.9 -	1844.9	1	SMDVHLSLANLEVWSK	metaloprotease; ~ Q/1114	
25 -	c 1.6	12.4	1094.7	1	YNSNLNTIR	Metaloprotease; ~Q7T1T4	
250		12.4 -	2340.2	1	ISHDNAQLLTAVVFDQQTIGR		
26a	0.4	63.3	1108.3	1	GDEYFYCR	Metaloprotease; ~ AD021503	
26b	0.5	45.7	-	-	Não identificado	-	
260	26c 0.3	0.3	20.0	2294.1	1	TNPDVPHCANINLLDDAVCR	Sorinoprotosoo: 5W050
200			50.9	1279.7	1	AAYPELPAEYR	Serinoprotease, ~ 3 w 939
26d	0.3	14.0	1242.3	1	DFSWEWTDR	Lectina tipo C; ~ AP42417	
27	1.8 70.1	7 1.0	70.1	2212.0	1	LHSWVECESGECCDQCR	Matalaprotosas: B6002
21		/0.1 -	1339.8	1	YVELVIVADHR	interatoprotease, ~ 10092	
20	28 1.3	1.3	00.2	1636.6	1	IYEIVNILNEIFR	
28			90.2 -	2084.9	1	YINYYKPQCILNEPLR	metaloprotease; ~ 980F9
29	0.7	42.6	1328.6	1	YIELVIVADHR	Metaloprotease; ~ DO21507	

# DISCUSSÃO

# 5. DISCUSSÃO

### - Isolamento, caracterização bioquímica e funcional da BpirMP

As metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs) podem induzir uma grande variedade de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos devendo ser melhor estudadas visando à caracterização de moléculas com alto potencial biotecnológico ou de modelos estruturais a serem utilizados na clínica-médica. SVMPs têm sido isoladas de diferentes espécies de serpentes, como: *Cerastes cerastes, Bothrops jararaca, Crotalus atrox, Bothrops atrox, Bothrops asper e Naja naja*.

Em geral, para o isolamento de proteases, a combinação de metodologias como troca iônica, exclusão molecular e afinidade são amplamente empregadas. Mazzi e colaboradores (2004) isolaram uma metaloprotease da peçonha de B. jararacussu chamada BjussuMP-I através de dois passos cromatográficos, sendo o primeiro deles em resina de exclusão molecular Sephacryl S-200 seguido por uma etapa cromatográfica em resina Phenyl Sepharose CL-4B. Para a metaloprotease BaP1 com  $Mr \sim 24.000$  isolada da peçonha de B. asper, Gutierrez e colaboradores (1995), utilizaram dois passos cromatográficos, um em resina de troca iônica em CM-Sephadex seguida por uma etapa de gel de filtração em resina Sephacryl S-200. Bernardes e colaboradores (2008) isolaram uma metaloprotease de baixa massa molecular da peçonha de B. moojeni denominada BmooMP-α através de três passos cromatográficos: troca iônica em resina DEAE-Sepharose, seguido por exclusão molecular em Sephadex G-75 e afinidade em resina Heparina Agarose. A metaloprotease Atroxlysina-I foi isolada da peçonha de B. atrox por exclusão molecular em resina Sephacryl S-200 e Sphadex G-50. Também da peçonha de B. atrox, a metaloprotease BaTx-I (PATIÑO et al., 2010) foi isolada pela combinação de dois passos cromatográficos em resina de troca iônica em CM-Sephadex C25 e afinidade em resina Affi-Gel Blue. A metaloprotease BpirMP foi isolada por três passos cromatográficos: exclusão molecular em coluna Sephacryl S200 (Fig. 4A), troca iônica em resina CM-Sepharose (Fig. 4B) e afinidade em resina Blue-Sepharose (Fig. 4C).

O grau de pureza da proteína foi avaliado por HPLC em coluna de fase reversa C2/C18 (Fig. 5). Normalmente etapas em colunas de fase reversa são utilizadas apenas para verificar o grau de pureza de metaloproteases, já que estas perdem suas atividades proteolíticas ao serem expostas aos solventes TFA e acetonitrila, possivelmente devido à desnaturação das enzimas promovida pelo baixo pH dos solventes.

A BpirMP é uma proteína de cadeia única como visualizado em gel de eletroforese tanto na presença como na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol (Fig. 4D), semelhante ao descrito para outras metaloproteases como BmooMP- $\alpha$  (BERNARDES et al., 2008) e BjussuMP-II (MARCUSSI et al., 2007).

Metaloproteases da classe P-I apresentam massa molecular em torno de 20 a 30 kDa (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012), como descrito para as metaloproteases: BH2 e BaP1 com massas moleculares de 26 e 24 kDa isoladas da peçonha de B. asper, respectivamente (BORKOW; GUTIÉRREZ; OVADIA, 1993; GUTIÉRREZ et al., 1995), BlaH1 de 28 kDa, isolada de Bothrops lanceolatus (STROKA et al., 2005), BthMP (23,5 kDa) da peçonha de Bothrops moojeni (GOMES et al., 2009), e atroxlysina-I (23 kDa), de B. atrox (SANCHEZ et al., 2010). A proteína isolada possui massa molecular de 23,5 kDa determinada por SDS-PAGE (Fig. 6) e 23,15 kDa determinado por espectrometria de massas (Fig. 7), sugerindo que a BpirMP é uma metaloprotease da classe P-I. Normalmente, moléculas glicosiladas tendem a migrar menos nos géis de eletroforese, apresentando massa molecular maior como demonstrado por um estudo realizado por Zelanis e colaboradores (2009) sobre N- e O-linked de proteínas de indivíduos adultos e recém-nascidos da espécie B. jararaca, no qual foi demonstrado que após a deglicosilação das proteínas havia uma diferença clara na mobilidade eletroforética das proteínas sob condições desnaturantes (ZELANIS et al., 2012). A pequena diferença entre a massa determinada pela migração em gel de eletroforese e por espectrometria de massas, além do fato de que não foi identificado nenhum sítio de glicosilação (Asn-X-Ser/Thr, em que X é qualquer aminoácido exceto prolina (SOARES; OLIVEIRA, 2009) na sequência de aminoácidos da BpirMP sugerem que a metaloprotease é uma molécula não glicosilada.

A azocaseína é um substrato não especifico para proteases. A hidrólise da azocaseína libera corante azo para o meio produzindo uma coloração que é detectada por absorbância em espectrofotômetro. Diversos trabalhos com SVMPs utilizaram a azocaseína para analisar a atividade enzimática das enzimas e também a estabilidade de tais moléculas frente a variações de pH, temperatura, inibidores e íons (GOMES et al., 2011; NAVES DE SOUZA et al., 2012). A BpirMP mostrou-se sensível à variação de pH e temperatura (**Fig. 10 A e B**), sendo a faixa de pH ótima entre 6,0 e 10,0 e temperatura ótima na faixa entre 4 a 40 °C. Similarmente ao observado para a BpirMP, Naves de Souza e colaboradores (2012) demonstraram que a metaloprotease BpMP-I, isolada da peçonha de *Bothropoides pauloensis*, apresentou atividade proteolítica ótima entre os valores de pH neutro a básico com decréscimo da atividade proteolítica no pH próximo a 3,0. Além disso, a atividade enzimática

foi maior em temperaturas mais baixas decaindo em temperaturas superiores a 60 °C. Estes resultados estão de acordo outros estudos com metaloproteases da classe P-I, que demonstraram que estas enzimas são susceptíveis a variações de pH e temperatura, diferentemente das serinoproteases (SWENSON; MARKLAND, 2005). A susceptibilidade das metaloproteases da classe P-I a tais variações pode ser explicada pela protonação dos resíduos de Histidina e consequentemente à perda do íon zinco (MANNING, 1995; RAMOS; SELISTRE-de-ARAÚJO, 2006). Um estudo com a molécula de acutolisina-C para avaliar mudanças na estrutura em diferentes valores de pH, demonstrou-se que, com uma mudança no pH de 8,0 para 3,0, o arranjo geral do íon zinco permaneceu tetraédrico, mas as distâncias de coordenação do íon zinco e a distância entre o resíduo glutâmico e a molécula de água aumentaram (XU et al., 2006). Na literatura, outros ensaios também são utilizados para avaliar a estabilidade de metaloproteases frente a variações de temperatura, pH e a influência de íons em suas atividades catalíticas. Gomes e colaboradores (2009) utilizaram o substrato caseína para avaliar a influência de vários íons e inibidores na atividade catalítica da BthMP isolada da peçonha de B. moojeni. A estabilidade da metaloprotease BjussuMP-II foi avaliada sobre o fibrinogênio (MARCUSSI et al., 2007).

A atividade proteolítica desta classe de enzima é dependente de metais, principalmente  $Zn^{2+}$  (MATSUI et al., 2000) e esta característica foi demonstrada para a BpirMP, uma vez que a incubação da enzima com agentes quelantes de íons, como o EDTA, 1,10-Fenantrolina e EGTA, inibiram a atividade proteolítica da metaloprotease como visualizado na **Fig. 11**. A metaloprotease BmooMP- $\alpha$  também teve a sua atividade proteolítica inibida depois da incubação da enzima com EDTA e EGTA (BERNARDES et al., 2008). A metaloprotease BleucMP teve a atividade proteolítica sobre a caseína significativamente reduzida quando incubada com EDTA (GOMES et al., 2011). De forma semelhante, a metaloprotease Batroxase teve a atividade fibrinogenolítica inibida quando incubada com EDTA e 1,10-Fenatrolina como descrito por Cintra e colaboradores (2012).

Bjanarson e Tu (1978) realizaram estudos com diferentes metaloproteases em que foi demonstrado que a concentração molar de zinco na molécula seria de aproximadamente 1:1, e que a retirada do íon zinco gerava uma mudança conformacional nas estruturas das moléculas levando à perda de suas atividades enzimáticas (BJARNASON; TU, 1978). De forma semelhante, análises de dicroísmo circular realizadas antes e depois da remoção do metal demonstram que a retirada do íon de zinco induz um decréscimo na capacidade de formação de  $\alpha$ -hélices (BJARNASON; FOX, 1994) modificando a estrutura tridimensional da molécula e consequentemente comprometendo a atividade enzimática de tais proteases. Pretzer e

colaboradores (1992) também demonstraram por dicroísmo circular que a retirada do íon zinco da molécula de fibrolase resultou na perda da estrutura secundária, particularmente das  $\alpha$ -hélices.

A incubação da BpirMP com os inibidores aprotinina, benzamidina e leupeptina não apresentou efeito sobre sua atividade (**Fig. 11**). Inibidores como a leupeptina e a benzamidina competem pelo sítio ativo das serinoproteases, sendo miméticos de arginina ou lisina, que são os aminoácidos pelos quais estas enzimas têm maior especificidade, não apresentando efeitos sobre metaloproteases (SERRANO; MAROUN, 2005). Resultados semelhantes foram descritos para outras metaloproteases isoladas como a BmHF-1 de *B. marajoensis* (TORRES-HUACO et al., 2010), a neuwiedase de *B. neuwiedi* (RODRIGUES et al., 2000), BleucMP de *Bothrops leucurus* (GOMES et al., 2011).

A atividade proteolítica da enzima BpirMP sobre a azocaseína foi inibida quando préincubada com agentes redutores como DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol (Fig. 11). A atividade das metaloproteases BmooMP- $\alpha$  (BERNARDES et al., 2008), BpMP-I (NAVES DE SOUZA et al., 2011) e Batroxase (CINTRA et al., 2012) também foram inibidas quando incubadas com  $\beta$ -mercaptoetanol. A inibição da atividade proteolítica das enzimas após a incubação com agentes redutores como o  $\beta$ -mercaptoetanol sugere a importância das pontes dissulfeto para a manutenção da estrutura da molécula e consequentemente da atividade catalítica.

Além do substrato azocaseína, a atividade proteolítica da metaloprotease BpirMP foi avaliada sobre o substrato azocolágeno (Fig. 9). Semelhante à azocaseína, o azocolágeno (colágeno impregnado com o corante azo) é usado como um substrato cromogênico não específico para ensaios proteolíticos. Após a proteólise, os fragmentos peptídicos que são solúveis e possuem a coloração roxa são libertados e podem ser detectados por absorbância a 540 nm (CHAVIRA; BURNETT; HAGEMAN, 1984). A atividade proteolítica da BpirMP variou de acordo com o aumento na dose de toxina utilizada, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses de 30; 45 e 60 µg.

Distúrbios da homeostasia são característicos do envenenamento ofídico por serpentes do gênero *Bothrops*, e estes efeitos são atribuídos principalmente as duas classes de enzimas: SVMPs e serinoproteases (KAMIGUTI et al., 2005). As SVMPs induzem estes efeitos degradando fatores importantes na cascata de coagulação como o fibrinogênio (KAMIGUTI et al., 2005). A maioria das metaloproteases de peçonhas de serpentes, hemorrágicas e não hemorrágicas, são fibrinogenolíticas degradando preferencialmente a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio, e de forma mais lenta a cadeia  $\beta$  (MARKLAND, 1998). A metaloprotease BpirMP apresentou atividade fibrinogenolítica dose-dependente, degradando rapidamente a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio, seguida pela degradação da cadeia  $\beta$  quando testada em maiores concentrações. A cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio permaneceu inalterada na maior dose testada (**Fig. 12**). Semelhante ao descrito para a BpirMP, outras metaloproteases da classe P-I também degradam preferencialmente a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio como: BthMP (GOMES et al., 2009), BmooMP- $\alpha$  (BERNARDES et al., 2008), atroxlisina-I de *B. atrox* (SANCHEZ et al., 2010), BlaH1 de *B. lanceolatus* (STROKA et al., 2005), Batroxase de *B. atrox* (CINTRA et al., 2012), a atroxase de *C. atrox* (TU et al., 1996), a lebetase de *V. lebetina* (SIIGUR; SIIGUR, 1991;), a BaP1 de *B. asper* (GUTIÉRREZ et al., 1995) e a neuwiedase de *B. neuwiede* (RODRIGUES et al., 2000). Há poucos relatos de metaloproteases isoladas de peçonhas de serpentes capazes de degradar especificamente a cadeia -  $\gamma$  do fibrinogênio, como a Hemorrhagic toxin f (HT-f) isolada da peçonha de *C. atrox* e a rFII isolada da peçonha de *Agkistrodon acutus* (NIKAI et al., 1984; JIANG et al., 2008).

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática hexamérica de 340 kDa constituído por duplas de três cadeias polipeptídicas A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$  que se encontram interligadas por pontes dissulfeto (YU et al., 1984; DOOLITTLE, 1984). A visualização em gel de eletroforese de produtos de degradação de baixa massa molecular gerados a partir da incubação do fibrinogênio com a metaloprotease BpirMP sugere uma hidrólise extensiva da molécula de fibrinogênio. Os fibrinopeptídeos gerados não são capazes de combinarem entre si, para formar monômeros de fibrina, consumindo e consequentemente causando a depleção de fatores de coagulação importantes para a cascata de coagulação, deixando o sangue mais fluido. A degradação extensiva dos fatores de coagulação está relacionada ao efeito anticoagulante observado em vítimas de acidentes ofídicos (MARKLAND, 1998). A ação inespecífica da metaloprotease sobre o fibrinogênio difere das serinoproteases que clivam o fibrinogênio em regiões específicas liberando fibrinopeptídeos, originando monômeros de fibrina responsáveis pela formação dos coágulos, exibindo assim ação coagulante sobre o plasma (DOOLITTLE, 1973). A BpirMP não foi capaz de coagular o plasma sanguíneo, complementando os resultados apresentados para a atividade fibrinogenolítica.

A metaloprotease BpirMP mostrou-se capaz de atuar sobre a fibrina, apresentando uma atividade dose-dependente (Fig. 13A). Outras metaloproteases da classe P-I descritas na literatura como BnP1 de *B. neuwiedi* (BALDO et al., 2008), a Bothrojaractivase de *B. jararaca* (BERGER; PINTO; GUIMARÃES, 2008), a BthMP de *B. moojeni* (GOMES et al., 2009) e a atroxlisina-1 de *B. atrox* (SANCHEZ et al., 2010) também apresentaram atividade fibrinolítica. Além de degradar a fibrina, a metaloprotease BpirMP apresentou atividade trombolítica sobre coágulos de sangue *in vitro*, dissolvendo o coágulo de sangue *in vitro*  completamente na dose de 100  $\mu$ g. Gremski e colaboradores (2007) observaram resultados semelhantes para a metaloprotease Leucurolisina-a de *B. leucuros* e de forma semelhante, Cintra e colaboradores (2012) relataram atividade trombolítica para a metaloprotease Batroxase, no qual a enzima degradou completamente o coágulo de sangue *in vitro* após 24 h na dose de 100  $\mu$ g.

Estudos recentes têm explorado o potencial de metaloproteases fibrin(ogen)olíticas de peçonhas de serpentes como agentes trombolíticos. Elas agem diretamente sobre a fibrina degradando os coágulos e impedindo a formação de novos coágulos e não são inibidas por inibidores de proteases endógenos. Por esta razão SVMPs fibrin(ogen)olíticas, que exibem baixa ou nenhuma atividade hemorrágica, têm sido consideradas como potenciais fármacos para o tratamento de pacientes com doenças vasculares, como descrito para a fibrolase e sua forma recombinante a alfimeprase (DEITCHER; TOOMBS, 2006; SAJEVIC et al., 2011).

A atividade hemorrágica tem sido atribuída a todas as três classes de SVMPs. O mecanismo proposto pelo qual estas enzimas são capazes de induzir hemorragia depende de diferentes fatores como a degradação proteolítica dos componentes da MB da parede de microvasos, especialmente capilares, degradação de fatores da coagulação e inibição da agregação plaquetária. Acredita-se que a hemorragia *in vivo* ocorre por um mecanismo dependente de duas etapas: (i) as proteínas da MB como fibronectina, colágeno tipo IV, proteínas da membrana de células endoteliais e proteínas envolvidas na adesão MB-célula como integrinas, são clivadas, o que leva ao enfraquecimento da estabilidade mecânica dos capilares; (ii) em um segundo passo, forças hemodinâmicas presentes na microcirculação, como a pressão hidrostática, contribuem para a distensão e ruptura da parede do capilar, com o consequente extravasamento. Assim, a hidrólise de componentes da MB é um passo fundamental na patogênese induzida por SVMPs (BARAMOVA et al., 1989; GUTIERREZ et al., 2005; MARKLAND, 1998).

O método mais utilizado para quantificar a atividade hemorrágica de proteínas de peçonhas consiste na injeção da peçonha ou de toxinas isoladas, por via intradérmica no dorso de animais (KONDO et al., 1960). Depois de algumas horas, o animal é sacrificado e a pele dessecada. Os autores recomendam a medição do diâmetro transversal das hemorragias, utilizando a média desses valores para a quantificação. A partir destas medições, é determinada a dose hemorrágica mínima (DHM), que é considerada a quantidade de proteína necessária para a indução de um halo hemorrágico com uma área definida. Modificações metodológicas têm sido realizadas desde o artigo original: (i) o tempo de incubação após a injeção, (ii) o animal experimental, (iii) a via de administração da toxina, e (iv) o método de
calcular o tamanho do halo hemorrágico (BJARNASON; TU, 1978; CIVELLO et al., 1983a). As modificações dificultam a comparação da DHM para as diferentes peçonhas e/ou toxinas, visto que tais modificações podem afetar a DHM. A DHM calculada para a BpirMP foi de 50 µg (Fig. 23) a qual foi semelhante a outras SVMPs da classe P-I, por exemplo, BthMP de *B. moojeni*, cuja DHM é de 30 µg (GOMES et al., 2009), BmHF-1 de *B. marajoensis*, cuja DHM é de 41,14 µg (TORRES-HUACO et al., 2010), Batroxase de *B. atrox* cuja DHM é de 10 µg (CINTRA et al., 2012), BaP1 no qual a DHM é de 20 µg (GUTIERREZ et al., 2005). Estas doses são elevadas quando comparadas com SVMPs da classe P-III, que possuem DHM em torno de 1 µg. Walby e colaboradores (2012) isolaram três metaloproteases da classe P-III denominadas EpyHTI de *E. pyramidum*, EcoHTI de *E. coloratus* e CcHTI *C. cerastes* cujas DHM são 1,9; 1,8 e 1,9 respectivamente. A DHM da VLH2 de *V. lebetina* (HAMZA et al., 2010) é de 3 µg e a BjussuMP-I de *B. jararacussu* possui DHM de 4 µg (MAZZI et al., 2006).

Em termos de potencial hemorrágico e diversidade das atividades biológicas, as SVMPs da classe P-III são as mais potentes entre as três classes. As SVMPs P-III são capazes de induzir hemorragia não só local, mas também sistêmica, enquanto que as SVMPs da classe P-I induzem hemorragia principalmente local (GUTIERREZ et al., 2005). Segundo Escalante e colaboradores (2006), três possibilidades podem explicar a diferença no potencial hemorrágico entre as classes de SVMPs: (i) as metaloproteases da classe P-III hidrolisam os componentes da membrana basal de forma mais intensa; (ii) as diferentes classes apresentam diferentes especificidades em relação aos substratos preferencialmente hidrolisados, com as SVMPs da classe P-III apresentando maior especificidade pelos componentes chaves da MB; (iii) a presença de domínios estruturais adicionais como semelhantes à desintegrina e rico em cisteína contribuem para o direcionamento das SVMPs a sítios relevantes na microvasculatura (ESCALANTE et al., 2006; FOX; SERRANO, 2005; BJARNASON; FOX, 1994).

Apesar das metaloproteases da classe P-I serem consideradas menos hemorrágicas que as da classe P-III, diferenças no potencial hemorrágico também são observadas dentro da classe P-I (RAMOS; SELISTRE DE ARAÚJO, 2004; ESCALANTE et al., 2011). Enquanto as metaloproteases neuwiedase (RODRIGUES et al., 2000), BjussuMP-II (MARCUSSI et al.; 2007) e BmooMP- $\alpha$  (BERNARDES et al., 2008) não exibem atividade hemorrágica, as metaloproteases BthMP (GOMES et al., 2009), BaP1 (GUTIERREZ et al., 1995), BaTx-I (PATIÑO et al., 2010), atroxlysina-I (SANCHEZ et al., 2010) exibem atividade hemorrágica

Devido ao fato de que as metaloproteases da classe P-I possuem apenas o domínio metaloproteinase, acredita-se que a hemorrágia induzida esta classe está relacionada à

degradação proteolítica de componentes da membrana basal como fibronectina, colágeno tipo IV e laminina (KAMIGUTTI, 2005). A metaloprotease BpirMP apresentou capacidade de degradar os componentes da MB como fibronectina, colágeno tipo IV (Fig. 14A e B), laminina e nidogênio (Fig. 15, Tabela 2). De forma semelhante, a Batroxase exibiu atividade sobre colágeno tipo IV e fibronectina, porém, não degradou laminina (CINTRA et al., 2012). Já a BjussuMP-II apresentou atividade proteolítica sobre colágeno I e fibrina (MARCUSSI et al., 2007). Bello e colaboradores (2006) isolaram uma metaloprotease da peçonha de *B. leucurus*, a leucurolisina A que hidrolisa fibrina, fibronectina, mas não a laminina. Por outro lado a LHF-II, isolada da peçonha de *L. muta muta* é capaz de hidrolisar fibronectina, laminina e colágeno tipo IV (RUCAVADO et al., 1999).

Uma forma de avaliar a degradação de componentes da MB por metaloproteases é a análise da hidrolise do matrigel por SDS-PAGE. A BpirMP degradou ligeiramente o matrigel após 1 h de incubação, apresentando degradação mais intensa das bandas correspondentes as cadeias  $\alpha$  da laminina e nidogênio após 6 h. Cintra e colaboradores (2012) também utilizaram o matrigel para avaliar a atividade proteolítica da Batroxase sobre os componentes da MB. A Batroxase degradou completamente as cadeias  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - da laminina após 15 minutos de incubação, não degradando o nidogênio mesmo após 3 h de incubação.

A análise dos produtos de degradação por gel de eletroforese, gerados a partir da incubação de componentes da MB (fibronectina, laminina, colágeno tipo IV, nidogênio ou matrigel), variando o tempo de incubação e/ou a concentração de toxina utilizada, permite visualizar diferenças não só na especificidade por tais substratos, mas também diferenças no padrão de fragmentação das proteínas pelas diferentes enzimas (CIVELLO et al., 1983; MARUYAMA et al., 1992; RUCAVADO et al., 1995). As variações tanto na especificidade como no padrão de fragmentação podem explicar a variação no potencial hemorrágico dentro da classe P-I, como observado por Escalante e colaboradores (2011) que compararam a capacidade de degradar componentes da MB de duas metaloproteases da classe P-I, que possuem potenciais hemorrágicos diferentes, a metaloprotease hemorrágica BaP1 isolada da peçonha de B. asper e a Leucurolisina-a (leuc-a), uma metaloprotease não hemorrágica isolada da peçonha de B. leucurus. Os autores concluíram que as duas metaloproteases diferem na sua capacidade de degradar substratos chaves da MB, principalmente colágeno tipo IV, perlecan e em menor grau, o nidogênio. Os autores ressaltaram o papel que o colágeno tipo IV desempenha na manutenção da estabilidade mecânica dos vasos sanguíneos e capilares sugerindo que a degradação desta proteína representa um passo fundamental no mecanismo de ação das SVMPs da classe P-I hemorrágicas (ESCALANTE et al., 2011a,b).

De forma semelhante, a capacidade da metaloprotease BpirMP em degradar componentes da BM foi comparada a atividade proteolítica da metaloprotease BaP1, *in vitro* (Fig. 18) e *in vivo* (Fig. 19). A metaloprotease BaP1, isolada de *B. atrox*, possui uma DHM de 20 µg, enquanto que a DHM da BpirMP é de 50 µg. Ambas as metaloproteases exibiram atividade proteolítica sobre os componentes da MB, porém a metaloprotease BaP1 apresentou atividade proteolítica mais rápida e intensa sobre os componentes da MB em relação a BpirMP. Estes resultados podem explicar a diferença no potencial hemorrágico de ambas as toxinas, uma vez que a BpirMP não se mostrou tão ativa sobre o colágeno tipo IV, que é uma proteína importante na manutenção da integridade estrutural da MB e consequentemente de vasos e capilares (ESCALANTE et al., 2011). Além disso, as metaloproteases atuaram sobre o substrato de maneira diferenciada gerando fragmento com massas moleculares diferentes. As diferenças nos fragmentos gerados sugerem que a maneira como estas proteínas degradam tais componentes é diferente e, *in vivo*, tais proteínas poderiam afetar a estabilidade estrutural da MB em diferentes intensidades e dessa forma, variando a intensidade da hemorragia provocada.

Escalante e colaboradores (2006) compararam a atividade de duas metaloproteases, BaP1 da classe P-I e a jararagina da classe P-III, sobre substratos da MB tanto *in vivo* como *in vitro*. Nesse estudo, os autores demonstraram que apesar das duas toxinas apresentarem atividade proteolítica semelhante sobre a azocaseína, elas diferem em relação à atividade sobre os componentes da MB. Enquanto a BaP1 apresentou degradou preferencialmente as cadeias  $\alpha$ - e  $\gamma$ - da laminina *in vitro*, a jararagina apresentou preferência pelo nidogênio.

Um sinal clínico evidente nos casos de envenenamentos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* é a lesão tecidual local proeminente, evidenciada por bolhas, equimoses e necrose, que se desenvolvem rapidamente após o acidente e muitas vezes resultam em sequelas permanentes (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Estes efeitos são induzidos por uma variedade de componentes da peçonha, tais como fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas, miotoxinas de baixa massa molecular e metaloproteases (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). O mecanismo pelo qual as metaloproteases são capazes de induzir o dano muscular não foi completamente elucidado. Gutiérrez e colaboradores (1995) estudaram o efeito da metaloprotease BaH1 e sugeriram que tal miotoxicidade não depende da ação direta dessa classe de toxinas em células musculares, mas sim de um mecanismo indireto, provavelmente isquemia devido ao sangramento, como consequência da ruptura da microvasculatura e visualizados histologicamente como um efeito tardio aparecendo algumas horas após a injeção das toxinas (GUTIÉRREZ et al., 1995; 2000). Os

autores observaram que as características ultra-estruturais das células musculares afetadas eram muito similares aos descritos em modelos experimentais de isquemia muscular que diferem acentuadamente das características ultra-estruturais das células musculares afetadas por miotoxinas ou outros agentes que agem diretamente sobre o tecido muscular e membrana plasmática das células. No caso de danos induzidos por miotoxinas, a hipercontração dos miofilamentos é uma característica evidente, não sendo observada uma desorganização no arranjo estriado das miofibrilas associados à perda de linhas Z (GUTIÉRREZ et al., 2000). Entretanto, alguns estudos não se encaixam na hipótese de lesão muscular relacionada à isquemia. A administração da metaloprotease bilitoxin, isolada de *Agkistrodon bilineatus*, e também da metaloprotease fracamente hemorrágica LHF-II de *Lachesis muta*, resultaram em lesão muscular logo após a injeção das toxinas (OWNBY et al., 1990; RUCAVADO et al., 1999), sugerindo um início mais precoce da miotoxicidade quando comparado com a maioria das metaloproteases estudadas. Ainda não se sabe se essas metaloproteases possuem uma ação citotóxica direta sobre células musculares ou se eles agem por outro mecanismo indireto ainda não identificado (GUTIÉRREZ et al., 2000).

Na intenção de avaliar a participação da metaloprotease BpirMP nos efeitos locais decorrente do envenenamento por B. pirajai, foram realizadas análises histopatológicas do músculo gastrocnêmio injetados com a toxina. Uma hora após a injeção de 50 µg da BpirMP (Fig. 21C e D) foi possível visualizar um discreto efeito hemorrágico e uma pequena quantidade de células necróticas. A presença de células necróticas e o aumento nos níveis de CK no plasma dos animais tratados com a toxina na primeira hora indicaram uma possível ação direta da metaloprotease BpirMP sobre células musculares (Fig. 22), de forma que uma nova análise dos tecidos com uma dose maior foi realizada. A análise dos tecidos injetados com 100 µg da toxina apresentou efeito hemorrágico mais intenso, entretanto a quantidade de células necróticas permaneceram inalteradas, muito similar aos tecidos injetados com 50 µg da BpirMP (Fig. 22D e E). A contaminação da amostra por fosfolipases A2 foi descartada injetando 100 µg da BpirMP desnaturada no musculo gastrocnêmio dos camundongos. A análise dos tecidos injetados com a BpirMP desnaturada apresentaram tecido de aspecto normal, sem alteração das fibras. Os resultados sugerem que apesar de induzir alterações morfológicas nas primeiras horas após a sua injeção, a toxina não possui uma ação direta relevante sobre o tecido muscular, e que o aumento nos níveis de CK observados pode ser decorrente da hemorragia induzida pela metaloprotease (Fig. 22).

De forma ao observado para a BpirMP, a metaloprotease neuwiedase induziu miotoxicidade moderada 3 h após a administração da toxina no músculo gastrocnêmio de

camundongos (RODRIGUES et al., 2001). Os autores sugeriram que provavelmente tais metaloproteases possam ser capazes de afetar diretamente as fibras do músculo esquelético por hidrolisarem componentes proteicos da membrana basal que circunda as células musculares, afetando assim a integridade das fibras musculares, ao contrário do mecanismo relacionado à isquemia como descrito para outras metaloproteases estudadas, uma vez que tais metaloproteases são desprovidas ou induzem baixa atividade hemorrágica (RODRIGUES et al., 2001).

O papel das SVMPs vai além da patologia local, uma vez que afetam drasticamente a regeneração do músculo esquelético. O fornecimento de sangue adequado e a presença de lâmina basal que envolve as fibras necróticas são fatores relevantes na regeneração do tecido após o envenenamento (GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000). Gutiérrez e colaboradores (1995) demonstraram que músculos de animais injetados com uma fosfolipase A<sub>2</sub> miotóxica isolada da peçonha de *B. asper*, induz necrose seguido por um processo normal de regeneração. Se esta miotoxina é injetada juntamente com a metaloprotease BaH1, a microvasculatura é afetada e a regeneração é limitada (GUTIERREZ et al., 1995; GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000). E, devido ao papel proeminente que a matriz extracelular desempenha na inflamação, migração celular e substituição de células, a degradação de componentes da matriz extracelular por SVMPs prejudica a resposta reparadora que se segue após a lesão muscular (RUCAVADO et al., 1999). Deste modo, as metaloproteases parecem ser responsáveis pela resposta regenerativa limitada do tecido muscular associada a muitos acidentes com serpentes da família Viperidae.

A miotoxicidade induzido por peçonhas de diferentes serpentes, incluindo do gênero *Bothrops*, pode ser evidenciado através da liberação *in vitro* de creatina cinase muscular. Calil-Elias e seus colaboradores (2002) demonstraram que a administração de doses crescentes da peçonha de *Bothrops jararacussu* por via intramuscular foi capaz de induzir miotoxicidade com um aumento proporcional de CK plasmática (NIKAI et al., 1984; FRANCESCHI et al., 2000). Rodrigues e colaboradores (2001) observaram um aumento significativo nos níveis de CK plasmática após injeção i.m. da metaloprotease neuwiedase, enquanto que os animais injetados com PBS não apresentaram aumento significativo dos níveis de CK plasmática. A injeção intramuscular da metaloprotease BpirMP elevou os níveis de CK plasmática após 1 hora, porém não foram significativos quando comparados ao controle negativo (PBS). Enquanto que a peçonha bruta elevou significativamente os níveis de CK plasmática, possivelvemte devido a grande quantidade de fosfolipases A<sub>2</sub> presente na peçonha como e demonstrado pela análise proteômica (**Fig. 38**).

Edema e hiperalgesia são manifestações comuns do processo inflamatório decorrente do acidente ofídico por serpentes do gênero *Bothrops*. Tais sinais são dependentes do sinergismo de diversos mediadores que resultam no aumento do fluxo sanguíneo, vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular, geralmente acompanhados de dor. Edema local proeminente frequentemente leva à isquemia e compressão neural, resultando em perda de tecido permanente, deficiência ou amputação. Estudos têm demonstrado que tanto o edema como a hiperalgesia induzido por peçonhas e ou componentes isolados não são totalmente neutralizados mesmo quando realizada a pré-incubação do soro com a peçonha antes da injeção em animais (FARSKY et al., 2000; PICOLO et al., 2002).

Várias toxinas isoladas de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* induzem reações inflamatórias e contribuem para a gravidade dos sintomas locais presentes no envenenamento. Entretanto as metaloproteases são as principais toxinas consideradas responsáveis pelo efeito inflamatório induzido pela peçonha de *Bothrops jararaca* (ZYCHAR, et al., 2010), diferentemente das serinoproteases que apresentaram um papel menor na inflamação promovida por esta peçonha (ZYCHAR et al., 2010). Tais resultados condizem com o relatado para duas serinoproteases isoladas da peçonha de *B. pirajai*, que apresentaram efeitos discretos sobre processos inflamatórios como a indução de edema e dor (MENALDO, 2012).

Além de induzir hemorragia e mionecrose, as SVMPs desempenham um papel relevante na complexa e multifatorial resposta inflamatória característica de envenenamento por serpentes da família Viperidae. A primeira evidência experimental de que SVMPs causam inflamação foi fornecida por Gutierrez e colaboradores (1995), que mostraram que uma SVMP da classe P-I isolada a partir da peçonha de *Bothrops asper* (BaP1) induziu edema de pata em camundongos. Após injeção intramuscular, a BaP1 induziu a formação de bolhas e infiltração de leucócitos no tecido (RUCAVADO et al., 1998; 1999).

Diversos estudos demonstraram a ação de peçonhas botrópicas na indução de edema e dor em patas de ratos e camundongos. A peçonha de *B. insularis* também foi capaz de induzir edema de pata apresentando maior pico de atividade edematogênica na terceira hora após a injeção da peçonha. Pequenas doses (0,25  $\mu$ g/pata) da peçonha de *B. insulares* foram suficientes para aumentar o volume da pata dos animais em 100%, e em doses maiores (0,5  $\mu$ g/pata), os volumes das patas dos animais aumentaram em até 300% (BARBOSA et al., 2003). Os autores reportaram que o edema induzido por esta peçonha é acompanhado de hemorragia, sugerindo a participação de metaloproteases.

A metaloprotease isolada a partir da peçonha de *B. pirajai* (BpirMP) foi capaz de induzir a formação do edema nas primeiras horas após a injeção intraplantar, em todas as

doses testadas, entretanto a dose de 50  $\mu$ g/pata apresentou uma resposta mais significativa, aumentando o volume da pata de camundongos em até 70% no pico da resposta edematogênica (2 horas após a injeção da metaloprotease) (Fig. 24).

A SVMP da classe P-I, Leucurolisina-a de *B. leucurus*, também induziu a formação de edema na pata de ratos de forma dose-dependente rapidamente após a injeção da toxina e se manteve por pelo menos 4 horas (GREMSKI et al., 2007). De forma semelhante, a metaloprotease da classe P-I, neuwiedase, de *B. neuwiedi* também induziu uma resposta edematogênica promovendo um aumento no volume da pata dos animais de mais de 100% quando testada na dose de 50 µg/pata nos primeiros 30 minutos após a injeção da toxina (RODRIGUES et al., 2001). Ao contrário das metaloproteases neuwiedase e leucurolisina-a que induziram a formação do edema, com pico de resposta após 30 da injeção das toxinas, o pico da resposta edematogênica induzida pela BpirMP ocorreu duas horas após a injeção, sugerindo a participação de diferentes mediadores na indução do edema de pata entre a toxinas.

Segundo Teixeira e colaboradores (2009), as metaloproteases são capazes de induzir a formação de edema devido à hidrólise de proteínas dos vasos, induzindo um processo inflamatório acompanhado de migração de neutrófilos e liberação de mediadores inflamatórios, com aumento do calibre vascular e do extravasamento de plasma (TEIXEIRA et al., 2009).

A resposta edematogênica induzida por peçonhas botrópicas e componentes isolados, como as metaloproteases, depende da formação de metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e leucotrienos, formados respectivamente pela ação de ciclooxigenases e lipooxigenases (TEIXEIRA et al., 2009). Estudos avaliando a participação de diferentes mediadores no processo inflamatório por diferentes peçonhas botrópicas como *B. asper* (CHAVES; BARBOZA; GUTIÉRREZ, 1995; CHACUR et al., 2001), *B. insularis* (BARBOSA et al., 2003), *B. jararaca* (TREBIEN; CALIXTO, 1989; PERALES et al., 1992) e *B. lanceolatus* (LÔBO DE ARAÚJO et al., 2000) demonstraram que o edema de pata induzido por estas peçonhas foram atenuados quando os animais foram tratados com inibidores de ciclooxigenases como indometacina e ácido acetilsalicílico, sugerindo a importância das prostaglandinas para este processo inflamatório. O medicamento dexametasona também é amplamente utilizado por diferentes autores como terapia antiedematogênica em modelos experimentais de edema de pata induzido (BARBOSA et al., 2003; GALVÃO-NASCIMENTO et al., 2009) pelos seus efeitos anti-inflamatórios, por inibir a ação da PLA<sub>2</sub> e consequentemente a síntese de proteínas pró-inflamatórias (prostaglandinas

e leucotrienos). No presente trabalho, o pré-tratameto dos animais com dexametasona atenuou significativamente o edema induzido pela BpirMP, em todos os tempos testados (Fig 25C), porém essa inibição não chegou a 100%, sugerindo a participação de outros mediadores nesta resposta infalamatória.

As prostaglandinas são mediadores considerados responsáveis pela vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular levando à formação do edema e são produzidas a partir da degradação de ácido araquidônico via ciclooxigenase, COX 1 e 2 (KANAOKA; URADE, 2003). Galvão-Nascimento e colaboradores (2009) avaliaram os diferentes mediadores envolvidos na indução de edema pela peçonha de *B. moojeni*. Os autores também observaram que metabólitos do ácido araquidônico participam da resposta edematogênica, e que a isoforma COX-1 é a responsável pela formação de prostaglandina na primeira hora da resposta, enquanto que a COX-2 estaria envolvida nas etapas tardias da resposta.

A resposta edematogênica induzida pela metaloprotease BpirMP foi significativamente atenuada com o pré-tratamento dos animais com valeril salicilato, inibidor seletivo da COX-1(Fig. 25F) e meloxicam inibidor seletivo da COX-2 (Fig. 25E). O antagonista da isoforma COX-1 apresentou inibição mais significativa nas primeiras duas horas após a injeção da toxina em relação ao antagonista da COX-2, de forma semelhante ao descrito por Galvão-Nascimento e colaboradores (2009).

Ademais, produtos de lipooxigenases também podem participar na indução do edema por peçonhas botrópicas, como descrito para as peçonhas de *B. lanceolatus* (DE FARIA et al., 2001) e *B. jararaca* (TREBIEN; CALIXTO, 1989; GALVÃO-NASCIMENTO et al., 2009), seja por sua capacidade de promover a produção de citocinas pró-inflamatórias, ou por sua capacidade quimiotática (ROCHA et al, 2003). O pré-tratamento dos animais com o medicamento inibidor da lipooxigenase, o ácido nordiidroguaiarético (Fig 25D), apresentou redução significativa do edema apenas no momento de maior intensidade da resposta edematogênica, não apresentando inibição significativa do edema nos demais tempos testados. Os resultados indicam que: (i) diferentes mediadores devem participar da resposta inflamatória induzida pela metaloprotease BpirMP, e que (ii) estes mediadores estariam atuando em diferentes pontos da resposta edematogênica.

Outros mediadores comumente relacionados à indução de edema são a histamina, serotonina e o óxido nítrico (BARBOSA et al., 2003). Calixto e colaboradores (2003) avaliaram a participação do óxido nítrico no edema induzido pela peçonha de *Apis mellifera*. O pré-tratamento dos animais com L-NAME reduziu significativamente o edema induzido por esta peçonha. De forma semelhante, Barbosa e colaborados (2003) e Guzzo e colaboradores

(2000) verificaram a redução do edema induzido pelas peçonhas de *B. insularis* e *B. jararaca* respectivamente, quando do pré-tratamento dos animais com inibidores da óxido nítrico sintetase, L-NAME. De Faria e colaboradores (2001) observaram que o edema de pata induzido pela peçonha de *B. lanceolatus* foi atenuado em torno de 30 % com o pré-tratamento dos animais com o antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub>, HOE-140 sugerindo a participação da bradicinina na resposta induzida por esta peçonha. No presente trabalho o pré-tratamento dos animais com os medicamentos HOE-140 (**Fig. 25B**) e L-NMMA (**Fig. 25A**) apresentaram inibição significativa do edema induzido pela metaloprotease BpirMP apenas no pico da resposta edematogênica, sugerindo a participação desses mediadores em pontos específicos da resposta inflamatória induzida pela BpirMP. A diferença entre os resultados apresentados e a literatura pode ser devido ao fato de que as peçonhas possuem outros componentes tóxicos que participam da indução da resposta edematogênica por outros mecanismos diferentes dos da metaloprotease BpirMP.

O aumento da permeabilidade vascular é o primeiro mecanismo para a formação do edema, dependente da produção e liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão. A histamina é sintetizada e liberada por diferentes células, especialmente basófilos, mastócitos, plaquetas e linfócitos, sendo estocada em vesículas ou grânulos e liberada sob estimulação. A histamina exerce sua ação por no mínimo, quatro diferentes receptores: H1R – H4R, e é um dos principais agentes inflamatórios que contribuem para a indução do edema por peçonhas do gênero *Bothrops* (GALVÃO-NASCIMENTO et al., 2010). O receptor H1 (H1R) é conhecido como o responsável pela maioria das respostas inflamatórias agudas. A melhor função caracterizada do receptor H2 da histamina (H2R) é a modulação da liberação de ácido gástrico. O receptor H3 da histamina (H3R) é altamente expresso no sistema nervoso e modula os níveis de neurotransmissores. H4R parece desempenhar um papel na modulação dos efeitos da histamina nas respostas inflamatórias e imunológicas (HUANG; THURMOND; 2008).

A redução do edema pelo tratamento dos animais com os medicamentos pirilamina e tioperamida, antagonistas dos receptores H1 e H3/H4 para histamina, respectivamente (Fig. 251 e J), indicam que a histamina, principalmente mediada por receptores do tipo H1, participa na formação do edema induzido pela BpirMP. Barbosa e colaboradores (2003) demonstraram que a histamina é um importante mediador do processo inflamatório induzido pela peçonha de *B. insularis*. Calixto e colaboradores (2003) demonstraram que o tratamento dos animais com o antagonista do receptor H1 para histamina inibiu significativamente o edema induzido pela peçonha de *Apis melífera*.

Ademais, os mastócitos são conhecidos por sua capacidade de secretar diversos mediadores químicos durante o processo inflamatório, sendo a histamina o principal mediador inflamatório armazenado em seus grânulos (HOFSTRA et al., 2003) contribuindo para a resposta edematogênica causada por peçonhas de diferentes espécies do gênero *Bothrops* (BARBOSA et al., 2003; De FARIA et al., 2001). A participação dos mastócitos no edema induzido pela BpirMP foi avaliada tratando os animais com cromoglicato de sódio (**Fig. 25G**), droga bloqueadora da degranulação de mastócitos, resultando em uma inibição significativa do edema. A resposta ao cromoglicato de sódio indica que a degranulação dos mastócitos é um evento importante nos efeitos induzidos pela BpirMP.

Teixeira e colaboradores (1994) foram os primeiros a fornecer evidências de que peçonhas botrópicas causavam hiperalgesia. Os autores demonstraram que a peçonha de *B. jararaca* induziu uma hiperalgesia persistente e independente da progressão do edema, mediada principalmente por prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF) (TEIXEIRA et al., 1994). A peçonha de *B. asper* também induziu hiperalgesia em ratos, induzindo uma resposta dependente do tempo e da dose, com pico duas horas após a injeção da peçonha, mediada principalmente por bradicinina e produtos de lipooxigenases (CHACUR et al., 2001).

Hiperalgesia pode ser definida como uma manifestação fisiopatológica que resulta da sensibilização de nociceptores (DALE et al., 2004). O dano tecidual leva à liberação de mediadores inflamatórios por nociceptores ativados ou por células que residem na área lesada, como os mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos e neutrófilos. Esta variedade de moléculas de sinalização inclui histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (BASBAUM et al., 2009).

A metaloprotease BpirMP foi capaz de reduzir o limiar nociceptivo dos animais (**Fig. 26**) em 20% já nas primeiras horas após a injeção da toxina, apresentando um pico de resposta (30%) na terceira hora. O pré-tratamento dos animais com L-NMMA não inibiu a ação da toxina sugerindo que não há participação do óxido nítrico na resposta hiperalgésica (**Fig. 27A**). O medicamento HOE-140 apresentou efeito parcial sobre a ação da toxina, reduzindo a hiperalgesia apenas em um ponto da resposta (**Fig. 27B**). Perkins e Kelly (1993) e Poole e colaboradores (1999) demonstraram que a hiperalgesia é mediada por ambos os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, e por isso, apesar da observação de que HOE-140 não reduziu a hiperalgesia induzida pela BpirMP nos tempos avaliados, um papel para os receptores B<sub>1</sub> e consequentemente da bradicinina não pode ser descartado (CHACUR, et al., 2001).

A redução do limiar nociceptivo induzido pela BpirMP parece ser mediada por metabólitos do ácido araquidônico, como prostaglandinas e leucotrienos, principalmente prostaglandina via ciclooxigenase-2. O pré-tratamento dos animais com o medicamento dexametasona, inibidor de fosfolipases A<sub>2</sub> endógenas (Fig. 27C) resultou em redução significativa da hiperalgesia. A ação das fosfolipases A<sub>2</sub> resulta na liberação de ácido araquidônico, precursor necessário para a síntese de eicosanóides via oxidação por ciclooxigenases e lipooxigenases (DENNIS, 2000). Além disso, o pré-tratamento com o inibidor da lipooxigenase, ácido nordiidroguaiarético (Fig 27D), também apresentou redução da hiperalgesia no momento de maior intensidade da resposta inflamatória (3 horas após a injeção da toxina), sugerindo a participação dos leucotrienos na resposta induzida pela metaloprotease BpirMP. O tratamento dos animais com o inibidor seletivo para COX-1, valeril salicilato (Fig. 27F), apresentou inibição significativa da hiperalgesia apenas na primeira hora após a injeção da toxina, enquanto que o pré-tratamento dos animais com meloxicam (Fig. 27E), inibidor seletivo para COX-2, apresentou inibição da hiperalgesia induzida na primeira hora após o tratamento com a metaloprotease.

Enquanto os mastócitos são responsáveis pela liberação de histamina e síntese de leucotrienos, os macrófagos liberam citocinas que agem nos nociceptores induzindo a liberação de outros mediadores como prostaglandinas e bradicinina (HOFSTRA et al., 2003). O pré-tratamento dos animais com o bloqueador da degranulação de mastócitos, cromoglicato de sódio (Fig. 27G), reduziu significativamente a hiperalgesia induzida pela BpirMP apenas na terceira hora. Da mesma forma, em relação ao tratamento dos animais com os antagonistas dos receptores de histamina H1, H2 e H3/H4, apenas o antagonista dos receptores H1 promoveu inibição significativa na terceira hora. Os resultados apresentados para a análise da hiperalgesia sugerem que outros mediadores, possivelmente citocinas, estão envolvidos na hiperalgesia induzida pela metaloprotease BpirMP, uma vez que nenhum medicamento foi capaz de inibir completamente a hiperalgesia induzida pela BpirMP.

Em resposta a um estímulo inflamatório, os leucócitos migram rapidamente para o local da lesão, atuando de forma relevante na resposta inflamatória devido à suas atividades fagocitária e secretória (NATHAN, 2006). Na resposta aguda, os leucócitos são os responsáveis pela fagocitose inicial dos agentes infecciosos e liberação de citocinas (TEIXEIRA et al., 2009).

Diferentes estudos demonstraram que peçonhas de serpentes são capazes de induzir a migração de leucócitos ao local da lesão, como as peçonhas de *B. asper* (GUTIÉRREZ et al., 1986), *B. erythromelas*, *R. alternatus* (FLORES et al., 1993), *B. jararaca* (ZYCHAR et al.,

2010) e *B. atrox* (MOREIRA et al., 2012). Moreira e colaboradores (2012) demonstraram que a peçonha de *B. atrox* induz a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos caracterizado por células mononucleares nas primeiras horas após a administração da peçonha, aumentando o número de neutrófilos após quatro horas da administração. Além disso, os autores demonstraram a liberação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) e eicosanóides PGE2, PGD2, tromboxano A<sub>2</sub> (TXA2) e leucotrieno B4 (LTB4) (MOREIRA et al., 2012). Flores e colaboradores (1993) demonstraram que as peçonhas de *R. alternatus* e *B. erythromelas* induziram a migração de leucócitos em camundongos mostrando ainda que estes efeitos estariam associados a metabólitos do ácido araquidônico via lipooxigenase, como leucotrieno B4. SVMPs foram consideradas as principais responsáveis pela capacidade da peçonha de *B. jararaca* em promover a migração de leucocitária (ZYCHAR et al., 2010).

A metaloprotease BaP1 induziu migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos caracterizada pela predominância de neutrófilos na fase inicial, seguido por um aumento de células mononucleares e associada com a expressão de moléculas de adesão de leucócitos e liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) (FERNANDES et al., 2006).

De forma similar, a BpirMP promoveu aumento significativo no número de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos 6 e 24 h após a administração da toxina (Fig. 29), complementando os resultados descritos acima para edema e hiperalgesia e indicando a participação da metaloprotease na resposta inflamatória induzida pela peçonha de *B. pirajai*. Após 24 h da administração da toxina, o número de neutrófilos permaneceu aumentado principalmente na maior dose avaliada (100  $\mu$ g), porém foi menor do que aquele observado no tempo de 6 h.

#### - Caracterização estrutural da metaloprotease BpirMP

A análise estrutural de toxinas permite compreender melhor a relação entre função biológica e estrutura de tais moléculas, uma vez que estas proteínas assumem estruturas tridimensionais e diferentes domínios funcionais (SHIVELY; PAXTON; LEE, 1989).

A família das metzincinas pode ser dividida em quatro subfamílias: astacinas, adamalysinas (incluindo as SVMPs), matrixinas (incluindo colagenases ou metaloproteases de matriz, MMP) e serralysinas (zinco-endopeptidases de bactérias). Estas famílias estão relacionadas por partilharem características estruturais semelhantes como: o sítio de ligação ao zinco de sequência consenso altamente conservada HEbxHxbGbxHD (onde b: resíduo

hidrofóbico volumoso, x: qualquer resíduo), o resíduo de metionina conservado, adjacente ao sítio catalítico formando o Met-turn, e também por partilharem uma estrutura tridimensional topologicamente semelhante, especialmente a região de ligação do íon zinco (BODE et al., 1993; GOMIS-RÜTH et al., 1994a, b; STOCKER et al., 1995).

O nome metzincina se origina do resíduo de metionina conservado na região Cterminal em relação ao motivo ligante de zinco, e foi denominado de Met-turn, variando sua posição na estrutura primária, porém bem conservado na estrutura tridimensional. Ele está localizado sob a base piramidal dos três resíduos de histidina que coordenam o sítio catalítico. Sua função na estrutura ainda não está bem clara, mas o Met-turn parece ser essencial para a integridade estrutural do sítio ativo da molécula. A sequência consenso para a família das reprolisinas é Cisteina-Isoleucina/Valina-Metionina (C-I/V-M) (BODE et al., 1993; STÖCKER; BODE, 1995).

A classe P-I das SVMPs, é a classe mais simples contendo apenas o domínio metaloprotease, com massa molecular entre 20 e 30 kDa, contendo em média de 200 a 210 resíduos de aminoácidos (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012). O sequenciamento da metaloprotease identificou 187 resíduos, obtendo-se a sequência consenso de ligação do íon zinco (HELGHNLGMEHD), as posições dos resíduos de histidina (141, 145, e 151) cataliticamente importantes para o sítio catalítico, além do resíduo de metionina adjacente ao sítio de ligação do íon zinco. A combinação dos dados de caracterização da molécula como a massa molecular (23,1 kDa), a identificação do domínio metaloprotease e o alinhamento múltiplo com outras metaloproteases de serpentes apresentando alto grau de identidade, confirmam que a BpirMP é uma metaloprotease da classe P-I.

O modelo da estrutura tridimensional da BpirMP foi construído utilizando técnicas computacionais de modelagem molecular, utilizando a metaloprotease BmooMP- $\alpha$  de *B. moojeni* (AKAO et al., 2010) como modelo. A molécula BmooMP- $\alpha$  foi escolhida por partilhar 88% de identidade com a BpirMP indicando que a estrutura tridimensional escolhida é um bom molde, devido ao fato que a modelagem molecular por homologia de proteínas está relacionada à porcentagem de identidade na qual o modelo é baseado e estabelecer uma correlação entre a similaridade estrutural e sequencial das duas proteínas (SANCHEZ et al., 1997).

A geração do modelo teórico da estrutura tridimensional da metaloprotease BpirMP só foi possível utilizando um pequeno fragmento da sequência modelo BmooMP- $\alpha$ , para completar a sequência da BpirMP, uma vez que não foi possível obter a sequência completa da molécula. A utilização do fragmento pode ser justificada pelo fato de que este fragmento é conservado nas duas sequências, BmooMP-α e BjussuMP-II, que apresentaram maior grau de identidade com a BpirMP (LINGOTT et al., 2009; WALLNOEFER et al., 2010).

O número de pontes dissulfeto varia dentro da família das metzincinas, sendo uma ponte dissulfeto altamente conservada (Cys117-Cys197) conectando os dois subdomínios, enquanto que uma variação no número de pontes dissulfeto ocorre no subdomínio menor, na porção C-terminal da molécula. De acordo com as sequências de aminoácidos já relatadas e depositadas no banco de dados, a maioria das SVMPs possue de 5 a 7 resíduos de cisteína podendo formar até três pontes dissulfeto (TAKEYA et al., 1989). A BpirMP possui cinco resíduos de cisteína confirmados pelo sequenciamento, indicando a formação de duas pontes dissulfeto e, por comparação entre as sequências de aminoácidos da BpirMP com outras metaloproteases da classe P-I, a molécula provavelmente possui um sexto resíduo de cisteína, na posição 180 que poderia participar na formação de uma terceira ponte dissulfeto. A primeira ponte dissulfeto, conectando os dois subdomínios, é formada pelos resíduos Cys116-Cys196, e duas conexões adicionais seriam Cys156-Cys180, Cys158-Cys163. As três pontes dissulfeto podem ser observadas no modelo teórico gerado (Fig. 33). Outras metaloproteases da classe P-I que tiveram suas estruturas terciárias resolvidas possuem três pontes dissulfeto como: BaP1 de B. asper (LINGOTT et al., 2009), Acutolisina A de A. acutus (GONG et al., 1998) e BmooMP-a de B. moojeni (AKAO et al., 2010), enquanto que Adamalysina II e atrolysina C possuem duas pontes de dissulfeto: Cys117-Cys197 e Cys157-Cys164 (GOMIS-RUTH et al., 1994; ZHANG et al., 1994).

Tem sido sugerido que a atividade proteolítica de SVMPs depende do estado de protonação do íon zinco coordenado pelos resíduos de histidina, e da capacidade de polarização do resíduo de ácido glutâmico. Dessa forma, o resíduo de ácido glutâmico (Glu) conservado na posição 143 (numeração de acordo com Adamalisina-II), desempenha um papel importante no mecanismo de ação das metaloproteases. Durante o primeiro passo da reação de hidrólise (adição), a molécula de água é desprotonada, permitindo o ataque nucleofílico ao átomo de carbono da ligação peptídica. Isso provoca uma reação intermediária e a protonação do resíduo de ácido glutâmico. Durante a segunda etapa (eliminação), o próton é transferido para o N-terminal do substrato que será clivado (LINGOTT et al., 2009). Na molécula BmooMP- $\alpha$ , o íon zinco apresenta um nova e distorcida coordenação octaédrica formada pelos átomos de histidinas e, adicionalmente, três moléculas de solvente. Em outras SVMPs tais como H2-proteinase, adamalysina-II e acutolysina A, o íon zinco é tetraedricamente coordenado pelos resíduos de histidinas e apenas uma molécula de solvente, que é estruturalmente relacionada com o resíduo Glu<sup>143</sup>, que polariza moléculas de solvente

antes do ataque nucleofílico à ligação peptídica do substrato (AKAO et al., 2010). Em relação à molécula BpirMP não é possível afirmar que apenas ou somente uma molécula de água participa da coordenação do íon zinco, uma vez que não foi possível obter o cristal da molécula.

SVMPs diferem significativamente na capacidade em induzir hemorragia. Apesar de apresentarem atividade proteolítica semelhante sobre diversos substratos *in vitro*, algumas destas enzimas são hemorrágicas, enquanto outras não são. Análises estruturais de várias SVMPs hemorrágicas e não hemorrágicas revelaram pequenas variações nas regiões dos loops em torno do sítio ativo. Esta região variável contém em média 25 resíduos de aminoácidos e é interrompida pelo motivo estruturalmente conservado Met-turn. Watanabe e colaboradores (2003) e de forma semelhante, Akao e colaboradores (2010) propuseram que o motivo formado por este segmento pode estar envolvido na indução de hemorrágicas da classe P-I. Nesta hipótese as metaloproteases não hemorrágicas da classe P-I apresentam resíduos de aminoácidos com uma cadeia lateral maior, causando um impedimento estérico, restringindo o reconhecimento e a interação com o substrato, enquanto que nas metaloproteases da classe P-I hemorrágicas, esses segmentos possuem resíduos polares menores permitindo a ligação e o reconhecimento do substrato no processo de indução de hemorragia.

Wallnoefer e colaboradores (2010) avaliaram por dinâmica molecular quatro estruturas de SVMPs da classe P-I, sendo duas hemorrágicas (BaP1 de *B. asper* e acutolysin-A de *A. acutus*) e duas não hemorrágicas (leucurolysina - A de *B. leucurus* e H2-proteinase de *T. flavoviridis*). As simulações mostram que apenas dois segmentos composo pelo resíduos 156 a 165 e 167 a 175 exibiram diferenças relevantes. Enquanto as enzimas hemorrágicas apresentaram maior flexibilidade no primeiro loop (resíduos 156-165), as SVMPs não hemorrágicas possuem um loop mais dinâmico no segmento 167-175. Os autores sugeriram que a flexibilidade do loop 156-165 é um pré-requisito para a ligação a diferentes proteínas/alvos e, portanto, este segmento pode definir a especificidade das SVMPs. Em relação ao segmento após o Met-turn referente aos resíduos nas posições 167 a 177, não foi observada nenhuma correlação direta entre a sequência de aminoácidos e a atividade proteolítica. Tanto as metaloproteases hemorrágicas como não hemorrágicas possuem a mesma sequência de aminoácidos nas posições 167, 169-172, 174-177. Os autores sugeriram enfaticamente que essa variação na flexibilidade do loop é a responsável pela diferente especificidade de cada toxina por um substrato.

O modelo gerado para a metaloprotease BpirMP apresentou seis (6) folhas  $\beta$  ao invés de cinco (5) como descrito na literatura. Entretanto, modelos gerados para algumas metaloproteases como a BmooMP- $\alpha$  (AKAO et al., 2010), Batroxase (CINTRA et al., 2012), BjussuMP-II (MARCUSSI et al., 2007) também apresentam seis fitas  $\beta$  em seus modelos de estrutura terciária. As estruturas terciárias foram geradas pelo mesmo programa, Pymol (DeLano, 2002), de forma que possa ser um artefato do programa utilizado (WALLNOEFER et al., 2010).

Diversas metodologias existem para a avaliação da qualidade de uma estrutura, seja ela determinada experimentalmente ou por modelagem por homologia. A análise do modelo estrutural gerado foi efetuada com a utilização do software PROCHECK (LASKOWSKI et al.,1993), que analisou a geometria global do modelo através do Diagrama de Ramachandran (apresenta os ângulos de ligação phi ( $\phi$ ) e psi ( $\psi$ ) da cadeia principal, tais ângulos são referentes às ligações Ca-N e Ca-C) e o G-fator (verifica os ângulos de ligação e a geometria covalente de toda a proteína).

Segundo Ramachandran (RAMACHANDRAN et al., 1963) uma estrutura de boa qualidade deve ter 90% ou mais de seus resíduos nas regiões mais favoráveis. As áreas em branco correspondem às regiões onde existem os choques estereoquímicos na proteína. Estas regiões não permitidas esterioquimicamente valem para todos os aminoácidos exceto a glicina (Gly) que é a única que não tem cadeia lateral e pode adotar os ângulos de torção  $\varphi e \psi$  em todos os quadrantes do diagrama de Ramachandran. As áreas vermelhas correspondem à conformação onde não há nenhum choque estereoquímico, ou seja, são as regiões permitidas e onde se encontram as hélices- $\alpha$  e folhas- $\beta$ . As áreas em amarelo escuro e claro mostram regiões limitantes, com ângulos favoráveis ou permitidos, respectivamente.

O G-factor global é uma medida da qualidade estereoquímica da estrutura como um todo. O valor ideal deste fator deve ser acima de -0,5. Valores no intervalo de -0,5 a -1,0 determinam a existência de resíduos na proteína que devem ser investigados e, valores abaixo de -1,0 indicam que os modelos apresentam qualidade estereoquímica ruim e devem ser investigados. O G-factor global é a melhor medida da qualidade estereoquímica total de uma molécula, pois representa a média de todos os G-factor obtidos para cada aminoácido da estrutura. O G-factor global para o modelo da BpirMP é de 0,04.

### - Análise proteômica da peçonha de B. pirajai

Apesar de as peçonhas de serpente serem misturas complexas podendo apresentar mais de 100 componentes, seus constituintes proteicos estão distribuídos em apenas algumas famílias como metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s), L-aminoácido oxidases, desintegrinas e lectinas do tipo-C (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007). A análise proteômica vem sendo bastante utilizada para determinar a distribuição destas diferentes famílias de proteínas em diferentes peçonhas de serpentes.

Muito poucas informações bioquímicas, farmacológicas e clínicas estão disponíveis para a peçonha da espécie *B. pirajai*. Estudos prévios relataram a peçonha desta espécie como proteolítica e miotóxica (QUEIROZ et al., 2008; COSTA et al., 1999; MANCUSO et al., 1995), porém até o momento nenhum estudo mais elaborado sobre as características desta peçonha foram relatados. A espécie *B. pirajai* ocorre em uma região de intensa exploração agrícola, e nesses locais, as florestas encontram-se bastante fragmentadas e reduzidas deixando essa espécie vulnerável e susceptível a extinção (AMARAL, 1923; ARGOLO, 2004; FREITAS, 1999).

No presente trabalho realizamos a caracterização proteômica inicial da peçonha bruta de B. pirajai. Inicialmente a peçonha foi fracionada em HPLC de fase reversa, e as frações resultantes analisadas por SDS-PAGE 15%. A composição da peçonha apresentou elevado conteúdo de fosfolipases  $A_2$  (40,2%) e metaloproteases (20,7%) semelhantemente ao descrito para outras peçonhas do gênero Bothrops (ÖHLER et al., 2009; CALVETE et al., 2009). Estes resultados do proteoma são complementados pelos estudos de isolamento de toxinas da peçonha de *B. pirajai*, uma vez que várias fosfolipases A<sub>2</sub> foram isoladas e descritas a partir desta peçonha, tais como: a BpirPLA2-I (TEIXEIRA et al., 2011) e as Piratoxinas-I, II e III (MANCUSO et al., 1995; TOYAMA, 1995; LEE et al., 1999). Além das fosfolipases A<sub>2</sub>, também já foram isoladas da peçonha de B. pirajai uma lectina tipo-C denominada BPL (HAVT et al., 2005) e uma L-aminoácido oxidase (BpirLAAO-I) (IZIDORO et al., 2006), além de duas serinoproteases com pronunciadas diferenças funcionais e estruturais, incluindo diferentes sequências de aminoácidos e taxas de glicosilação (MENALDO et al., 2012). O baixo rendimento descrito por Menaldo e colaboradores (2012) para estas serinoproteases (em torno de 0,5% para cada) é coerente com o observado pelo proteoma de *B. pirajai*, no qual a classe das serinoproteases corresponde a apenas 7,1% do total da composição proteica da peçonha. Semelhantemente à peçonha de B. pirajai, as peçonhas de B. colombienses (CALVETE et al., 2009) e *B. asper* (ALAPE-GIRÓN et al., 2008) também apresentaram baixo conteúdo de serinoproteases em suas composições.

A análise proteômica de diferentes peçonhas de serpentes de diferentes gêneros da Europa, Ásia, África, América Central e Brasil demonstrou que as SVMPs é um dos principais componentes das peçonhas, variando entre 11 a 65% do total de proteínas (CALVETE et al., 2007a). Os resultados apresentados para a peçonha de B. pirajai são semelhantes aos descritos na literatura uma vez que cerca de 20% da composição de proteína são de SVMPs. Öhler e colaboradores (2009) relataram o proteoma da peçonha da serpente R. alternatus (anteriormente B. alternatus). A caracterização da peconha identificou mais de 100 componentes com massas moleculares entre 1 e 100 kDa, distribuídos em seis famílias: fosfolipases A2, serinoproteases, L-aminoácido oxidases, desintegrinas, inibidores de trombina e SVMPs, com o predomínio de metaloproteases da classe P-III (ÖHLER et al., 2009). Um dado interessante obtido a partir da análise proteômica da peçonha de B. pirajai está relacinado a fração 25 (figura 37) que é representada por SVMPs da classe P-I, na qual a banda 25b corresponde a aproximadamente 50% de todo o conteúdo de SVMP da peçonha. A metaloprotease BpirMP possui massa molecular semelhante a banda 25b e também o mesmo tempo de retenção quando analisada nas mesmas condições empregadas para o fracionamento da peçonha bruta. Dessa forma, podemos sugerir que a BpirMP corresponde à banda 25b. Entretanto é necessário ressaltar que a abundância obtida para essa banda (25b) sugere a presença de isoformas na mesma faixa de massa que a BpirMP e corroborada por: (i) o rendimento obtido para a BpirMP foi ao redor de 3%, (ii) a banda 25b abrange uma pequena faixa de massa molecular ao redor de 20 a 25 kDa, (iii) vários autores já descreveram o isolamento de isoformas de uma mesma peçonha, que apresentam similariadades estruturais (Mr, pI) mas, diferem nos efeitos fisiológicos induzidos (BAZAA et al., 2005; CALVETE et al., 2003).

A análise da peçonha de *B. colombiensis* foi realizada por Calvete e colaboradores (2009). Os autores reportaram que os componentes da peçonha estão distribuídos em oito famílias de proteínas, sendo quatro famílias predominantes: SVMPs, LAAOs, serinoproteases e PLA<sub>2</sub>s. Cerca de 40% dos componentes da peçonha são de fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidases corresponde a 5,7% e apenas 1% dos componentes são serinoproteases. As metaloproteases correspondem a 42% da composição da peçonha, sendo que 11,3% das SVMPs identificadas pertencem à classe P-III. Além das famílias descritas acima, os autores foram capazes de identificar outros componentes como desintegrinas, peptídeo potenciadores de bradicinina e CRISP (CALVETE et al., 2009).

A peçonha de *B. insularis* também foi caracterizada em relação aos seus componentes por Valente e colaboradores (2009). Semelhante ao descrito para a peçonha de *B. colombienses*, quatro famílias de proteínas predominaram na peçonha de *B. insularis*, sendo elas: metaloproteases, fosfolipases A<sub>2</sub>, lectinas do tipo-C e serinoproteases (VALENTE et al., 2009).

Alape-Girón e colaboradores (2008) utilizaram a combinação de técnicas de fracionamento por HPLC seguido por caracterização das frações por SDS-PAGE, sequenciamento N-terminal e "mass fingerprint" para comparar as peçonhas de *B.asper* de duas regiões diferentes: Caribe e Pacifico da Costa Rica. Os autores concluíram que as peçonhas das duas populações de *B. asper* partilham em torno de 50% de similaridade, compartilhando tanto enzimas idênticas como isoformas de PLA<sub>2</sub>, metaloproteases e serinoproteases. A peçonha das serpentes provenientes da região Caribenha apresentou elevado conteúdo de SVMPs, cerca 40%, (no qual 32% são da classe P-I e 8% da classe P-III), 28% de PLA<sub>2</sub>s e 18% de serinoproteases, enquanto que a peçonha das serpentes da região do Pacífico apresentaram maior conteúdo de PLA<sub>2</sub>s (45%) e metaloproteases 44% (30% da classe P-I) e apenas 5% do conteúdo sendo de serinoproteases (ALAPE-GIRÓN et al., 2008).

Takashima e colaboradores (2008) realizaram um estudo comparando as peçonhas de *B. cotiara* e *B. fonsecai*. As peçonhas foram fracionadas em HPLC de fase reversa, seguido por caracterização das frações por SDS-PAGE, sequenciamento N-terminal e MALDI-TOF "mass fingerprinting". Os autores identificaram cerca de 30 proteínas distribuídas em oito famílias na peçonha de *B. cotiara* e nove famílias para a peçonha de *B. fonsecai*. Ambas as peçonhas apresentaram desintegrinas, metaloproteases, serinoproteases, L-aminoácido oxidases, lectinas tipo-C, NGF, CRISP e fragmentos desintegrina-like/rico em cisteína (DC). A diferença relevante entre as duas peçonhas está no fato que a peçonha de *B. fonsecai* apresenta alto conteúdo de fosfolipases A<sub>2</sub>, enquanto que esta família de proteínas não foi identificada na peçonha de *B. cotiara* (TAKASHIMA et al., 2008).

Os resultados apresentados sugerem que a BpirMP é uma proteína que participa do processo inflamatório decorrente do envenenamento por serpentes *B. pirajai* além de atuar sobre o sistema hemostático exibindo atividade trombolítica, sugerindo que a BpirMP é uma molécula promissora para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de distúrbios da coagulação sanguínea, semelhante ao descrito para a Fibrolase/alfimeprase (GUAL et al., 1991; DEITCHER; TOOMBS, 2005).

## CONCLUSÕES

### 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou resultados importantes relacionados às características bioquímicas, estruturais e funcionais de uma metaloprotease da classe P-I isolada da peçonha de *Botrops pirajai*. Os resultados apresentados acrescentam informações relevantes que poderão melhorar a compreensão da relação entre estrutura e efeitos biológicos para essa classe de toxina considerada uma das principais responsáveis pelos efeitos locais decorrentes do acidente ofídico. Os resultados obtidos demonstram que:

• A BpirMP é uma metaloprotease da classe P-I com massa molecular de 23,0 kDa, de cadeia única como apresentado na SDS-PAGE.

• É uma enzima capaz de degradar as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio não apresentando atividade sobre a cadeia  $\gamma$ .

• A metaloprotease degradou coágulos de fibrina e trombos *in vitro*, além de ser incapaz de coagular o plasma.

• A BpirMP é uma enzima relativamente estável frente a variações de temperatura e pH, apresentando redução significativa da sua atividade proteolítica em temperaturas superiores a 60 °C e pHs ácidos (pHs 3,0 e 4,5).

• A atividade proteolítica da metaloprotease foi significativamente reduzida na presença de agentes quelantes como EDTA, EGTA e 1,10-Fenantrolina e também na presença de agentes redutores ( $\beta$ -mercaptoetanol e DTT) confirmando a importância da estrutura tridimensional para a atividade catalítica da molécula. Na presença de inibidores específicos para serinoproteases (benzamidina, leupeptina e aprotina) não ocorreu alterações na atividade proteolítica da enzima.

• A BpirMP é uma metaloprotease fracamente hemorrágica com DHM de 50 µg.

• A metaloprotease BpirMP é capaz de degradar componentes da MB tanto *in vitro* como *in vivo*, com diferente especificidade em relação aos diferentes componentes da MB. A atividade da enzima mostrou-se mais evidente sobre a laminina, fibronectina e nidogênio em relação ao colágeno tipo IV, principalmente quando comparada à atividade da metaloprotease BaP1. Dessa forma, o baixo potencial hemorrágico da toxina deve estar relacionado à sua baixa atividade proteolítica sobre o colágeno tipo IV.

• Os resultados obtidos sugerem que a BpirMP participa ativamente da resposta inflamatória decorrente do envenenamento, induzindo a formação de edema de pata em ratos

mediado principalmente por metabólitos do ácido araquidônico via ciclooxigenases e aminas biogênicas, como a histamina.

• Além do edema, a BpirMP reduziu significativamente o limiar nociceptivo dos animais.

• Ademais, a BpirMP induziu a migração de leucóticos para a cavidade peritoneal de camundongos.

• BpirMP é capaz de induzir lesão moderada em diferentes tecidos (muscular, renal, cardíaco, esplênico e pulmonar) visualisados pela análise histológica.

• O mecanismo pelo qual a BpirMP induz os efeitos patológicos locais não está totalmente esclarecido, sugerindo um mecanismo indireto, talvez pela ação sobre os componentes da membrana basal dificultando a regeneração tecidual após a lesão decorrente do envenenamento.

• A sequência parcial de aminoácidos e a estrutura tridimensional da BpirMP apresentou alta identidade com outras metaloproteases do gênero *Bothrops*. A molécula possui os resíduos de histidina do sítio ativo, altamente conservados, além da sequência consenso HELGHNLGMEH e o Met-turn (CVM) adjacente ao sítio catalítico.

O conhecimento da composição proteica das peçonhas, assim como o papel de seus diversos componentes durante o envenenamento, auxilia no desenvolvimento de tratamentos mais específicos e eficazes de vítimas de acidentes ofídicos. A metaloprotease BpirMP mostrou-se fracamente hemorrágica porém ativa sobre fatores da coagulação sanguínea como a fibrina, degradando coágulos de sangue *in vitro*, sugerindo uma potencial aplicação desta toxina para o tratamento de desordens da coagulação e como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos trombolíticos. Assim, o isolamento e a ampla caracterização funcional e estrutural de metaloproteases tornam-se importantes ferramentas para novos estudos sobre as SVMPs e suas possíveis aplicações terapêuticas e biotecnológicas.

# REFERÊNCIAS

## 7. REFERÊNCIAS<sup>\*</sup>

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

ALAPE-GIRÓN. A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FLORES-DÍAZ, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J.J. Snake venomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. J. Proteome Res. v. 7, p. 3556-71, 2008.

AMARAL, A. New genera and species of snakes. Proc. New Engl. Zool. Club. v. 8, p. 85-105, 1923.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ÂNGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie** v. 82(8), p. 755-763, 2000.

ARGOLO, A.J.S. 2000. *Bothrops pirajai*. In: IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species.** Disponível em: <a href="http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/39902/0>">http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/39902/0></a>. Acesso em: 10 out. 2012.

ASTROF, S.; HYNES, R.O.; Fibronectins in vascular morphogenesis. Angiogenesis v. 12, p. 165-75, 2009.

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

BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. Arch Biochem Biophys. v. 275, p. 63-71, 1989.

BARBOSA, A.M.; DO AMARAL, R.O.; TEIXEIRA, C.F.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon** v. 42, p. 515-523, 2003.

BARTON, G.M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. J Clin Invest. v. 118, p. 413-20, 2008.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell v. 139, p. 267-84, 2009.

BAZAA, A.; MARRAKCHI, N.; EL AYEB, M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Snake venomics: comparative analysis of the venom proteomes of the tunisian snakes *Cerastes cerastes, Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. **Proteomics**. v. 5, p. 4223-35, 2005.

<sup>&</sup>lt;sup>\*</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023/2002.

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

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

BERNARDE, P.S. Changes in the Brazilian poisonous snake classification and their implications in the medical literature. **Gaz. Méd.** v. 81, p. 55-63, 2011.

BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; COSTA, T.R.; GOMES, M.S.R.; TORRES, F.S.; COSTA, J.; BORGES, M.H.; RICHARDESON, M.; SANTOS, D.M.; PIMENTA, A.M.C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOARES, A.M.; OLIVEIRA, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)oliytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon** v. 51, p.574-584, 2008.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. Methods Enzymol. v. 248, p.345-68, 1995.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W., Characterization of two hemorrhagic zinc proteinases, toxin c and toxin d, from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Biochim. Biophys. Acta** v.911, p.356–363, 1987.

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

BJARNASON, J.B.; HAMILTON, D.; FOX, J.W. Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. **Biol. Chem. Hoppe Seyler.** v. 369 Suppl. 121-9, 1988.

BJARNASON, J.B.; TU, A.T. Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. **Biochemistry** v. 17, p. 3395-404, 1978.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F.X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins' **FEBS** v. 331. p. 134-140, 1993.

BODE, W.; KRESS, L.F.; MEYER, E.F.; GOMIS-RÜTH, F.X. The crystal structure of adamalysin II, a zincendopeptidase from the snake venom of the eastern diamondback rattlesnake *Crotalus adamanteus*. **Braz J Med Biol Res**. v. 27, p. 2049-68, 1994b.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake Bothrops asper. **Toxicon** v. 31, p. 1137-50, 1993.

BOSMAN, F.T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. J Pathol. v. 200(4), p. 423-428, 2003.

BOU-GHARIOS, G.; PONTICOS, M.; RAJKUMAR, V.; ABRAHAM, D. Extra-cellular matrix in vascular networks. Cell Prolif. v. 37, p. 207-220, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**. v. 72, p. 248-254, 1976.

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

BREEN, E.C. Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro. J Appl Physiol. v. 88, p. 203-9, 2000.

CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A.M.; MELO, P.A. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by Bothrops jararacussu venom. **Histol. Histopathol**. v. 17, p. 463-470, 2002.

CALIXTO, M.C.; TRICHÊS, K.M.; CALIXTO, J.B. Analysis of the inflammatory response in the rat paw caused by the venom of *Apis melifera* bee. **Inflamm. Res**. v.2, p. 132-9, 2003.

CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake Venomics. Strategy and applications. J. Mass Spectrom. v. 42, p. 1405-14, 2007.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters** v. 583, p. 1736–1743, 2009.

CARDOSO, J. L. C. Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo-SP: Sarvier, 2003. 468 p.

CASTRO, H.C.; DUTRA, D.L.S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B. Bothroalternin, A thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon** v. 36, p. 1903-1912, 1998.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon** v. 39(8), p. 1173-81, 2001.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake Bothrops asper (terciopelo) in mice. **Toxicon** v. 33, p. 31-9, 1995.

CHAVIRA, R. JR.; BURNETT, T.J.; HAGEMAN, J.H. Assaying proteinases with azocoll. Anal. Biochem. v. 136, p. 446-50, 1984.

CINTRA, A.C.; DE TONI, L.G.; SARTIM, M.A.; FRANCO, J.J.; CAETANO, R.C.; MURAKAMI, M.T.; SAMPAIO, S.V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon** v. 60, p. 70-82, 2012.

CIVELLO, D.J.; MORAN, J.B.; GEREN, C.R. Substrate specificity of a hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. **Biochem.** v. 22, p. 755-62. 1983.

CLISSA, P.B.; LAING, G.D.; THEAKSTON, R.D.; MOTA, I.; TAYLOR, M.J.; MOURA-DA-SILVA, A.M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon** v. 39, p. 1567-73. 2001

COSTA, P.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse *extensor digitorum longus* (edl) muscle preparation. **Toxicon** v. 37, p. 1143-1153, 1999.

DALE, C.S.; GONÇALVES, L.R.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; DA SILVA, A.M.; GIORGI, R. The C-terminus of murine s100a9 inhibits hyperalgesia and edema induced by jararhagin. **Peptides** v. 25, P. 81-9, 2004.

DALTRY, J.C.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. Nature v. 379, p. 537-540, 1996.

DAVIS, G.E.; SENGER, D.R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. **Circ. Res.** v. 97, p. 1093-107, 2005.

DE AZEVEDO, W.F. JR.; WARD, R.J.; CANDURI, F.; SOARES, A.; GIGLIO, J.R.; ARNI, R.K.; Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic phospholipase A<sub>2</sub>-homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Toxicon** v. 36, 1395-406, 1998.

DE FARIA, L.; ANTUNES, E.; BON, C.; DE ARAÚJO, A.L. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon** v. 39, p. 825-30, 2001.

DEITCHER, S.R.; TOOMBS, C.F. Non-clinical and clinical characterization of a novel acting thrombolytic: alfimeprase. **Pathophysiol Haemost. Thromb.** v. 34, p. 215-20, 2005.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA, 2002.

DENNIS, E.A. Phospholipase A<sub>2</sub> in eicosanoid generation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. v. 161, p. 32-5, 2000.

DOOLITTLE, R.F. Fibrinogen and fibrin. Annu Rev Biochem. v. 53, p. 195-229, 1984.

DOOLITTLE, R.F. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion. Adv. Protein. Chem. V. 27, p. 1-109, 1973.

DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. Toxicon v. 40(6), p. 659-665, 2002.

DU, X.Y.; SIM, D.S.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells Mol. Dis**. v. 36, p. 414-421, 2006.

EDGAR, W.; PRENTICE, C.R.M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thromb. Res.** v. 2, p. 85-95. 1973.

ESCALANTE, T., RUCAVADO, A., FOX, J.W., GUTIÉRREZ, J.M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. J. Proteomics v. 74, p. 1781-1794, 2011.

ESCALANTE, T.; ORTIZ, N.; RUCAVADO, A.; SANCHEZ, E.F.; RICHARDSON, M.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M. Role of Collagens and Perlecan in Microvascular Stability: Exploring the Mechanism of Capillary Vessel Damage by Snake Venom Metalloproteinases. **PLoS ONE**, v. 6(12), 2011.

ESCALANTE, T.; SHANNON, J.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; GUTIÉRREZ, J.M.; FOX, J.W. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. **Arch Biochem Biophys**, v. 455, p. 144-53, 2006.

FARSKY, S.H.; GONÇALVES, L.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; CORREA, A.P.; RUCAVADO, A.; GASQUE, P.; TAMBOURGI, D.V. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. **Mediators Inflamm**. v. 9, p. 213-21, 2000.

FARSKY, S.H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon** v. 35, p. 185-93, 1997.

FENWICK, A.M.; GUTBERLET, R.L.; EVANS, J.A.; PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops, Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zool. J. Linn. Soc.** v. 156, p. 617–640, 2009.

FERNANDES, C.M.; TEIXEIRA, C.F.P.; LEITE, A.C.R.M.; GUTIÉRREZ, J.M.; ROCHA, F.A.C. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF-a and PGE<sub>2</sub>-dependent mechanisms. **Brit. J. Pharm.** v. 151, p. 1254–1261, 2007.

FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F. Inflammatory effects of BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon** v. 47, p. 549-559, 2006.

FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erytromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon** v. 31, p. 1551-1559, 1993.

FOX, J.W.; MAYER, U.; NISCHT, R.; AUMAILLEY, M.; REINHARDT, D.; WIEDEMANN, H.; MANN, K.; TIMPL, R.; KRIEG, T.; ENGEL, J. Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. **Embo J**. v. 10, p. 3137-46, 1991.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon** v. 45, p. 969-85, 2005.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. J. Proteomics v. 72, p. 200-9, 2009

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

FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J.M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. Toxicon v. 38, p. 63-77, 2000.

FRANCO, L. F. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil. São Paulo, Editora Sarvier, p.13-32, 2003.

FREITAS, M.A. Serpentes da Bahia e do Brasil. FEIRA DE SANTANA: DALL. p. 79, 1999.

FURTADO, M.F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; ROCHA, M.M. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon** v. 8, p. 401-10, 2006.

GALVÃO NASCIMENTO, N.; SAMPAIO, M.C.; AMARAL OLIVO, R.; TEIXEIRA, C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, v. 55, p. 343-52.

GAY, C.C.; LEIVA, L.C.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; ACOSTA de PERÉZ, O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 546–554, 2005.

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

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

GOMIS-RÜTH, F.X.; KRESS, L.F.; KELLERMANN, J.; MAYR, I.; LEE, X.; HUBER, R.; BODE, W. Refined 2.0 A X-ray crystal structure of the snake venom zinc-endopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. J. Mol. Biol. v. 239, p. 513-44, 1994a.

GONG, W.; ZHU, X.; LIU, S.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*. J. Mol. Biol. v. 283, p. 657-68, 1998.

GREMSKI, L.H.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SADE, Y.B.; OTUKI, M.F.; RICHARDSON, M.; GREMSKI, W.; SANCHEZ, E.F.; VEIGA, S.S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon** v. 50, p. 120-34, 2007.

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

GUTIÉRREZ, J.M. Snakebite envenoming: A public health perspective. In: Maddock, J. (Ed.), Public Health-Methodology, Environmental and Systems Issues. InTech, Rojeka, Croatia, pp. 131-162, 2012. GUTIÉRREZ, J.M., THEAKSTON, R.D.G. AND WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med.** v. 3, p.150, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Rev. Biol. Trop.** v. 34, p. 209-214, 1986.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Memorias Instituto Butantan** v. 51, p. 211–223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon** v. 42, p. 915-31, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, M.; DÍAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon** v. 33, p. 19-29, 1995.

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

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A; ESCARLANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon** v. 45, p. 997-1077, 2005a.

GUZZO, M.L.; FARSKY, S.H.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E.; SILVA, M.A.; MELLO, S.B. Role of kinins and nitric oxide on the rabbit arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** v. 38, p. 1535-46, 2000.

HAMZA, L.; GARGIOLI, C.; CASTELLI, S.; RUFINI, S.; LARABA-DJEBARI, F. Purification and characterization of a fibrinogenolytic and hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Vipera lebetina* venom. **Biochimie** v. 92, p. 797-805, 2010.

HAVT, A.; TOYAMA, M.H.; NASCIMENTO, N.R.F.N.; TOYAMA, D.O.; NOBRE, A.C.L.; MARTINS, A.M.C.; BARBOSA, P.S.F.; NOVELLO, J.C.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.C.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 37, p. 130-141, 2005.

HOFSTRA, C.L.; DESAI, P.J.; THURMOND, R.L.; FUNG-LEUNG, W.P. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. v. 305, p. 1212-21, 2003.

HUANG, J.F.; THURMOND, R.L. The new biology of histamine receptors. **Curr. Allergy Asthma Rep**. v. 8, p. 21-7, 2008.

IZIDORO, L.F.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.L.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.** v. 14, p. 7034-7043, 2006. JIA, L.G.; SHIMOKAWA, K.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the adams family of proteins. **Toxicon** v. 34, p. 1269-76, 1996.

JIANG, W.; MA, T.; SU, X.; QIU, P.; YAN, G. Enzymatic activities and functional characterization of a novel recombinant snake venom proteinase from *Agkistrodon acutus*. **Biochimie** v. 91 p. 277-287, 2008.

JOSEPH, J.S.; KINI, R.M. Snake venom prothrombin activators homologous to blood coagulation factor Xa. **Haemostasis** v. 31, p. 234–240, 2001

JUNQUEIRA, L.C.; E CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 7<sup>a</sup> edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; HO, P.L. A survey of gene expression. And diversity in the venom glands of the pitviper snake Bothrops insularis through the generation of expressed sequence tags (ESTs). Gene v. 299, p. 279-291, 2002.

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

KANAOKA, Y.; URADE, Y. Hematopoietic prostaglandin D synthase. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. v. 69, p. 163-7, 2003.

KANG, T.S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M.T.; SINHA, M.; KUMAR, R.P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R.K.; SINGH, T.P.; KINI, R.M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS** J. v. 278, p. 4544-76, 2012.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; DE SILVA, H.J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.** v. 5, p. 218, 2008.

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

KOH, D.C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci. v. 63, p. 3030-41, 2006.

KOHFELDT, E.; SASAKI, T.; GÖHRING, W.; TIMPL, R. Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. J Mol Biol. v. 282, p. 99-109, 1998.

KOHLHOFF, M.; BORGES, M.H.; YARLEQUE, A.; CABEZAS, C.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F. Exploring the proteomes of the venoms of the peruvian pit vipers *Bothrops atrox, B. barnetti* and *B. pictus.* J. **Proteomics** v. 75, p. 2181-95, 2012.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. Jpn. J. Med. Sci. Biol. v.13, p.43-52, 1960.

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature v. 227, p. 680–685, 1970.

LASKOWSKI R, A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Cryst. v. 26, p. 283-291, 1993.

LEE, M.S.Y.; SCANLON J.D. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. **Biol. Rev.** v. 77, p. 333-401, 2002.

LEITÃO, D.P.; POLIZELLO, A.C.; ROTHSCHILD, Z. Coagulation and fibrinolysis in capybara (Hydrochaeris hydrocaeris), a close relative of the guinea-pig (Cavia porcellus). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** v. 125, p. 113-120, 2000.

LEÓN, G.; SÁNCHEZ, L.; HERNÁNDEZ, A.; VILLALTA, M.; HERRERA, M.; SEGURA, A.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J.M. Immune response towards snake venoms. **Inflamm. allergy drug targets** v. 10, p. 381-98, 2011.

LINGOTT, T.; SCHLEBERGER, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; MERFORT, I. High-Resolution Crystal Structure of the Snake Venom Metalloproteinase BaP1Complexed with a Peptidomimetic: Insight into Inhibitor Binding. **Biochemistry** v. 48, p. 6166–6174, 2009.

LÔBO de ARAÚJO, A.; SOUZA, A.O.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; FLORES, C.A.; BON, C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon** v. 38, p. 209-21, 2000.

LOMONTE, B.; TSAI, W.C.; BONILLA, F.; SOLÓRZANO, A.; SOLANO, G.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J. Snake venomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper *Bothriechis supraciliaris* from Costa Rica. **Toxicon** v. 59, p. 592-599, 2012.

LU, Q.; CLEMETSON, J.M.; CLEMETSON, K.J. Snake venoms and hemostasis. J. Thromb. Haemost. v. 3, p. 1791-9, 2005.

MAKOGONENKO, E.; TSURUPA, G.; INGHAM, K.; MEDVED, L. Interaction of fibrin(ogen) with fibronectin: further characterization and localization of the fibronectin-binding site. **Biochemistry** v. 41, p. 7907-13, 2002.

MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.; LACHAT, J.J.; DE ARAUJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon** v. 5, p. 615-26, 1995.

MANNING, M.C. Sequence analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from *Agkistrodon contortrix* contortrix. **Toxicon.** v. 33, p. 1189-200, 1995.

MARCUSSI, S.; BERNARDES, C.P.; SANTOS-FINHO, N.A.; MAZZI, M.V.; OLIVEIRA, C.Z; IZIDORO, L.F.M.; FULY, A.L.; MAGNO, A.J.; BRAZ, A.S.K.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides** v. 28, 2328-2339, 2007.

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

MARKLAND, F.S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon** (in press), 2012. doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; SHIMAYA, K.; MIHARA, H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. **Toxicon** v. 30, p. 1387-97, 1992.

MASKOS, K.; BODE, W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. **Mol. Biotechnol.** v. 25, p. 241-66, 2003.

MATSUDA, M.; YAMANAKA, T.; MATSUDA, A. Distribution of fibronectin in plasma and liver in liver diseases. Clin. Chim. Acta v. 118, p. 191-9, 1982.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1477, p. 146-156, 2000.

MAZZI, M.V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; STÁBELI, R.G.; FRANCO, J.J.; TICLI, F.K. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon** v.44, p.215–23, 2004.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. v. 454, p. 428-35, 2008.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil. São Paulo: Editora Sarvier, 2003, p. 33-61.

MENALDO, D.L.; BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; MOURA, L.D.; FULY, A.L.; ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from Bothrops pirajai snake venom. **Biochimie** (in press), 2012. doi: 10.1016/j.biochi.2012.07.007.

MINER, J.H.; YURCHENCO, P.D. Laminin functions in tissue morphogenesis. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. v. 20, p. 255-84, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim eletrônico epidemiológico, 2010. Disponível em: <a href="http://portal.saude.gov">http://portal.saude.gov</a>. br/portal/arquivos/pdf/boletim\_eletronico\_02\_ano10.pdf> Acesso em: 15 set. 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, 2008. Disponível em: <a href="http://www.mma.gov.br/estruturas/179/\_arquivos/vol\_ii\_reptis.pdf">http://www.mma.gov.br/estruturas/179/\_arquivos/vol\_ii\_reptis.pdf</a>> Acesso em: 15 set. 2012.

MISE, Y.F.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; CARVALHO, F. M. Envenomation by *Bothrops* in the State of Bahia: epidemiological and clinical aspects **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 40, p. 569-573, 2007.

MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M.C.; NASCIMENTO, N.G.; DA SILVA, H.B.; FERNANDES, C.M.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon** v. 60, p. 12-20, 2012.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat. Rev. Immunol. v. 6, p. 173-82, 2006.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. Nature v. 420, p. 846-52, 2002.

NAVES DE SOUZA, D.L.; GOMES, M.S.; FERREIRA, F.B.; RODRIGUES, R.S.; ACHÊ, D.C.; RICHARDSON, M.; BORGES, M.H.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Comp.** Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. v. 161, p. 102-9, 2012

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A.T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). Arch. Biochem. Biophys. v. 231, p. 309-319, 1984.

OHLER, M.; GEORGIEVA, D.; SEIFERT, J.; VON BERGEN, M.; ARNI, R.K.; GENOV, N.; BETZEL, C. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **J. Proteome. Res.** v. 9, p. 2422-37, 2010.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venom. **Toxicon** v. 42, p. 841-54, 2003.

OLIVO R,A.; TEIXEIRA, C.F.; WALLACE, J.L.; GUTIERREZ, J.M.; ZAMUNER, S.R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of *Bothropic* venoms. **Toxicon** v. 49(5), p. 670-7, 2007.

OWNBY, C.L.; NIKA, T.; IMAI, K.; SUGIHARA, H. Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). **Toxicon** v. 28, p. 837-46, 1990.

PATIÑO, A.C.; PEREAÑEZ, J.A.; NÚÑEZ, V.; BENJUMEA, D.M.; FERNANDEZ, M.; RUCAVADO, A.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic P-I metalloproteinase from colombian *Bothrops atrox* venom. **Toxicon** v. 56, p. 936-43, 2010.

PATTERSON, S.D.; AEBERSOLD, R.H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature gen. supplement** v. 33, p. 311-323, 2003.

PERALES, J.; AMORIM, C.Z.; ROCHA, S.L.G.; DOMONT, G.B.; MOUSSATCHE, H. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antibothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. Agents Actions v. 37, p. 250-259, 1992.

PERKINS, M.N.; KELLY, D. Induction of bradykinin B1 receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiationinduced thermal hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.** v. 110, p. 1441-4, 1993. PETERSEN, T.E.; THOGERSEN, H.C.; SKORSTENGAARD, K.; VIBE-PEDERSEN, K.; SAHL, P.; SOTTRUP-JENSEN, L.; MAGNUSSON, S. Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 80, p. 137-41, 1983.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo Ass. Med. Bras. v. 47, p. 24 - 29, 2001.

PONCE-SOTO, L.A.; BONFIM, V.L.; NOVELLO, J.C.; NAVARRO OVIEDO, R.; YARLEQUÉ CHOCAS, A.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a serine protease, BaIII-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. **Protein J**. v. 26, p. 387-394, 2007.

POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol**. v. 126, p. 649-56, 1999.

PRETZER, D.; SCHULTEIS, B.; VANDER VELDE, D.G.; SMITH, C.D.; MITCHELL, J.W.; MANNING, M.C. Effect of zinc binding on the structure and stability of fibrolase, a fibrinolytic protein from snake venom. **Pharm. Res.** v. 9, p. 870-7, 1992.

RAMACHANDRAN, G.N. Protein Structure and Crystallography. Science v. 141, p. 288-291, 1963.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. - Snake venom metaloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 142, p. 328–346, 2006.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metallopeptidases using bioinformatic tools. **Toxicon** v. 44, p. 529-38, 2004.

RANDOLPH, A.; CHAMBERLAIN, S.H.; CHU, H.L.; RETZIOS, A.D.; MARKLAND FS, J.R.; MASIARZ, F.R. Amino acid sequence of fibrolase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. **Protein Sci.** v. 1, p. 590-600, 1992.

REY-SUÁREZ, P.; NÚÑEZ, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redtail coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. J. **Proteomics v.** 75, p. 655-67, 2011.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Bites by snakes in the genus *Bothrops*: a series of 3,139 cases. **Rev. Soc. Bras.** Med. Trop. v. 30, p. 475-80, 1997.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. Agents Actions v. 8, p. 45-49, 1978.

ROCHA, P.N.; PLUMB, T.J.; COFFMAN, T.M. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation **Springer. Semin. Immunopathol.** v. 25, p. 215-27, 2003.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; FRANCESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; Giglio, J.R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie** v. 83, p. 471-9, 2001.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; ROGRIGUES, V.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys**. v. 38, p. 213-24, 2000.

RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol.** v. 63, p. 186-99, 1995.

RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. Int. J. Exp. Pathol. v. 79, p. 245-54, 1998.

RUCAVADO, A.; SÁNCHEZ, E.; FRANCESCHI, A.; MAGALHAES, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from Lachesis muta muta snake venom. **Toxicon** v. 37, p. 1297-1312, 1999.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon** v. 57, p. 627-45, 2011.

SALI, A.; POTTERTON, L.; YUAN, F.; VAN VLIJMEN, H.; KARPLUS, M. Evaluation of comparative protein modelling by MODELLER. **Proteins** v. 23, p. 318-326, 1995.

SANCHEZ, E.F.; SCHNEIDER, F.S.; YARLEQUE, A.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S.G.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from peruvian *Bothrops atrox* (jergón) snake venom acts both on blood vessel ecm and platelets. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 496, p. 9-20, 2010.

SANCHEZ, R.; SALI, A. Advances in comparative protein-structure modeling. Current. Opinion in Structural Biology v. 7, p. 206-214, 1997.

SASAKI, T.; FÄSSLER, R.; HOHENESTER, E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. J. Cell. Biol. v. 164, p. 959-63, 2004.

SCHERAGA, H.A. The thrombin-fibrinogen interaction. Biophys. Chem. v. 112, p. 117-30, 2004.

SCHWARZBAUER, J. Basement membranes: Putting up the barriers. Curr. Biol. v. 9, p. 242-4, 1999.

SCHYMEINSKY, J.; NEDBAL, S.; MIOSGE, N.; PÖSCHL, E.; RAO, C.; BEIER, D.R.; SKARNES, W.C.; TIMPL, R.; BADER, B.L. Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. **Mol. Cell. Biol**. v. 22, p. 6820-30, 2002.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol**. v. 6, p. 1191-7, 2005.

SERRANO, S.M.; MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon** v. 45, p. 1115-1132, 2005.
SHIVELY, J.E.; PAXTON, RJ.; LEE, T.D. Highlights of protein structural analysis. Trends Biochem. Sci. v. 14, p. 246-52, 1989.

SIIGUR, E.; AASPOLLU, A.; TRUMMAL, K.; TONISMAGI, K.; TAMMISTE, I.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, J. Factor X activator from *Vipera lebetina* venom is synthesized from different genes. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1702, p. 41–51, 2004.

SIIGUR, E.; SIIGUR, J. Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* (snake) venom. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1074, p. 223-9, 1991.

SOARES, S.G.; OLIVEIRA, L.L. Venom-sweet-venom: N-linked glycosylation in snake venom toxins. **Protein Pept. Lett.** v. 16, p. 913-919, 2009.

STÁBELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.** v. 12, p. 2881-6, 2004.

STÖCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins **Current Opinion in Structural Biology** v. 5, p. 383-390, 1995

STROKA, A.; DONATO, J.L.; BOM, C.; HYSLOP, S.; DE ARAÚJO, A.L. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. **Toxicon** v. 45, p. 411-20, 2005

SUKI, B.; BATES, J.H. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. **Respir Physiol** Neurobiol. v. 163, p. 33-43, 2008.

SWENSON, S.; MARKLAND, F.S.Jr. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. Toxicon v. 45, p. 1021-39, 2005.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian adam/adamts family proteins. **Biochim. Biophys. acta**. v. 1824, p. 164-76, 2012.

TAKEYA, H.; ARAKAWA, M.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; OMORI-SATOH, T. Primary structure of h2proteinase, a non-hemorrhagic metalloproteinase, isolated from the venom of the habu snake, *Trimeresurus flavoviridis*. J. Biochem. v. 106, P. 151-7, 1989.

TANZER, M.L. Current concepts of extracellular matrix. J. Orthop. Sci. v. 11, p. 326-31, 2006.

TANZER, M.L. Extracellular matrix: extracellular matrix biochemty. Science v. 227, p. 289-90, 1985.

TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops Jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (paf). **Toxicon** v. 32, p. 419-26, 1994.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops* asper venom. **Toxicon** v. 154, p. 988-997, 2009.

TEIXEIRA, C.F.; CHAVES, F.; ZAMUNÉR, S.R.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; CRUZ-HOFLING, M.A.; FERNANDES, I.; GUTIÉRREZ, J.M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **Int. J. Exp. Pathol**. v. 86(2), p. 107-15, 2005.

TEIXEIRA, C.F.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; ZAMUNER, S.F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 100, p. 181-184, 2005.

TORRES-HUACO, F.D.; PONCE-SOTO, L.A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S. Purification and characterization of a new weak hemorrhagic metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* snake venom. **Protein J** v. 29, p. 407-16. 2010

TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; VIEIRA, C.A.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. J. Protein Chem. v.17, p.713-8, 1998.

TREBIEN, H.A.; CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. Agents Actions v.26, p. 292-300, 1989.

TU, A.T.; BAKER, B.; WONGVIBULSIN, S.; WILLIS, T. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. **Toxicon** v. 34, p. 1295-300, 1996.

VÁCHOVÁ, L.; MORAVCOVÁ, J. Two microassays for determination of a wide range of proteolytic activities using Azocoll as substrate. **Biochem. Mol. Biol. Int**. v. 30, p. 311-8, 1993.

VALENTE, R.H.; GUIMARÃES, P.R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A.G.; SOARES, M.R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M.R.; LEÓN, I.R.; ROCHA, S.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; WERMELINGER, L.S.; DUTRA, D.L.; LEÃO, L.I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; HO, P.L.; ZINGALI, R.B.; PERALES, J.; DOMONT, G.B. *Bothrops insularis* venomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **J Proteomics** v. 72, p. 241-55, 2009.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In: Farmacodinâmica. (CORBETT, C.E.). Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. p. 679-697, 1982.

WAHBY, A.F.; ABDEL-ATY, A.M.; EL-KADY, E.M. Purification of hemorrhagic SVMPs from venoms of three vipers of Egypt. **Toxicon** v. 59, p. 329–337, 2012.

WALLNOEFER, H.G.; LINGOTT, T.; GUTIÉRREZ, J.M.; MERFORT, I.; LIEDL, K.R. Backbone flexibility controls the activity and specificity of a protein-protein interface: specificity in snake venom metalloproteases. J. Am. Chem. Soc. v. 132, p. 10330-7, 2010.

WATANABE, L.; SHANNON, J.D.; VALENTE, R.H.; RUCAVADO, A.; ALAPE-GIRÓN, A.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein Sci.** v. 12, p. 2273-81, 2003.

WU, W.B.; CHANG, S.C.; LIAU, M.Y.; HUANG, T.F. Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. **Biochem. J**. v. 357, p. 719-28, 2001.

XU, X.; LIU, X.; ZHANG, L.; CHEN, J.; LIU, W.; LIU, Q. Effects of metal ions on the conformation and activity of acutolysin d from agkistrodon acutus venom. **Protein J**. v. 25, p. 423-30, 2006.

YU, S.; SHER, B.; KUDRYK, B.; REDMAN, C.M. fibrinogen precursors. Order of assembly of fibrinogen chains. J. Biol. Chem. v. 259, p. 10574-81, 1984.

YURCHENCO, P.D.; AMENTA, P.S.; PATTON, B.L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biol**. v. 22, p. 521-38, 2004.

ZAMUNER, S.R.; TEIXEIRA, C.F. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators Inflamm**. v. 11, p. 351-7, 2002.

ZELANIS, A.; VENTURA, J.S.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; FURTADO, M.F.D. Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: An ontogenetic approach. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 145, p. 601–609, 2007.

ZHANG, D.; BOTOS, I.; GOMIS-RÜTH, F.X.; DOLL, R.; BLOOD, C.; NJOROGE, F.G.; FOX, J.W.; BODE, W.; MEYER, E.F. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin c (form d). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 91, p. 8447-51, 1994.

ZYCHAR, B.C.; DALE, C.S.; DEMARCHI, D.S.; GONÇALVES, L.R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A<sub>2</sub> to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon** v. 55, p. 227-234, 2010.