Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Maurício Ventura Mazzi

“Caracterização funcional e estrutural de uma metaloprotease
hemorrágica isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*”

Ribeirão Preto
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Maurício Ventura Mazzi

**“Caracterização funcional e estrutural de uma metaloprotease hemorrágica
isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*”**

Ribeirão Preto
2005

Maurício Ventura Mazzi

“Caracterização funcional e estrutural de uma metaloprotease hemorrágica isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do título de Doutor em Toxicologia, Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Profa. Dra. Suely Vilela.

Co-orientador: Andreimar Martins Soares.

Ribeirão Preto

2005

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

Mazzi, Maurício Ventura

Caracterização funcional e estrutural de uma metaloprotease hemorrágica isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*./ Maurício Ventura Mazzi; orientadora Suely Vilela. - Ribeirão Preto, 2005.

142 p. : fig.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. Área de Concentração: Toxicologia)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. metaloprotease. 2. atividade hemorrágica e proteolítica. 3. veneno de serpentes. 4. *Bothrops jararacussu*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maurício Ventura Mazzi

Caracterização funcional e estrutural de uma metaloprotease hemorrágica isolada da
peçonha de *Bothrops jararacussu*

Banca Examinadora

Profa. Dra. Suely Vilela (Orientadora)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Prof. Dr. José Roberto Giglio

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Wagner Ferreira Santos

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

Defendida e aprovado pela Comissão Julgadora em: 19/08/2005

Dedico este trabalho:

Aos meus Pais, Nércio Mazzi e Mari Inez Ventura Mazzi.

*Foram esses anos todos de ensinamentos que me fizeram Homem,
seguindo vossos exemplos de vida e guardando as essências de amor e carinho
que me foram transmitidos.*

.

À minha querida Denise,

*Sublime, sua companhia me fez encontrar o verdadeiro sentido de amar
Em cada palavra, cada olhar de compreensão, cada gesto de generosidade seus,
sentia-me revestido de um nobre sentimento, que desconhecia na sua verdadeira essência.*

Mostrou-me com simplicidade que,

*A inteligência sem amor me faria perverso
A justiça sem amor me faria implacável
A diplomacia sem amor me faria hipócrita
O êxito sem amor me faria arrogante
A riqueza sem amor me faria avarento
A docilidade sem amor me faria servil
A pobreza sem amor me faria orgulhoso
A beleza sem amor me faria ridículo
A autoridade sem amor me faria tirano
O trabalho sem amor me faria escravo
A simplicidade sem amor me depreciaria
A lei sem amor me escravizaria
A vida sem AMOR não tem sentido.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Suely Vilela pela confiança e ensinamentos que auxiliaram não somente na conclusão desse trabalho, mas também me proporcionaram experiência.

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares pela co-orientação. Mostrou-me com paciência, dedicação, amizade e ética que a ciência pouco significaria se não fosse transmitida.

Aos professores do departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela contribuição na minha formação profissional, durante a participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino “PAE”, com atividade docente supervisionada.

Aos professores do Centro de Química de Proteínas (Prof. Dr. Lewis Joel Greene e Prof. Dr. José César Rosa) e Pós-graduandos (Helen Julie e Vítor Faça) pela disponibilidade do laboratório e contribuição científica para determinar a composição em aminoácidos e a sequência N-terminal da enzima.

Aos colegas de laboratório Fábio Kiss Tieli, Carolina Daláqua Sant’Ana, Silvana Marcusi, os quais nos meus incansáveis dias de trabalho estiveram presentes.

Aos técnicos do Laboratório de Toxicologia da FCFRP, Adélia e João Franco pelo auxílio técnico-científico, os quais foram fundamentais para realização desse trabalho.

Aos técnicos e funcionários do laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP pela disponibilidade científica e de infra-estrutura para realização de alguns experimentos.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela realização dos testes de inibição da agregação plaquetária.

Ao Instituto Codomiro Picado da Costa Rica, pela realização dos ensaios imunoenzimáticos.

À todos os autores de livros e manuscritos de circulação nacional e/ou internacional, pela contribuição relevante no desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto que de alguma forma contribuíram.

Ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática dos domínios de uma metaloprotease.....	07
Figura 2: Modelos estruturais de duas “Metzincins”	09
Figura 3: Reação de acoplamento do aminoácido livre ao fenilisotiocianato (PITC).....	33
Figura 4: Cromatografia em Sephacryl S-200 do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i>	38
Figura 5: Cromatografia em Phenyl Sepharose CL-4B da fração BJI.....	39
Figura 6: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da fração BjussuMP-I.....	41
Figura 7: Eletroforese em PAGE-SDS da fração BjussuMP-I.....	42
Figura 8: Curva padrão para determinação da massa molecular da BjussuMP-I.....	43
Figura 9: Determinação da (DHM) do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i>	45
Figura 10: Determinação da (DHM) da fração BJI.....	46
Figura 11: Determinação da (DHM) da fração BjussuMP-I.....	47
Figura 12: Visualização do halo hemorrágico nas peles de camundongos.....	48
Figura 13: Atividade hemorrágica-Influência do tempo.....	49
Figura 14: Atividade hemorrágica –Influência do pH.....	50
Figura 15: Atividade edematogênica do veneno bruto, fração BJI e BjussuMP-I.....	52
Figura 16: Atividade miotóxica induzida pela BjussuMP-I.....	53
Figura 17: Atividade gelatinolítica da BjussuMP-I.....	54
Figura 18: Atividade da BjussuMP-I sobre o colágeno.....	55
Figura 19: Atividade anticoagulante da BjussuMP-I.....	58
Figura 20: Atividade fibrinogenolítica da BjussuMP-I: Variação da concentração.....	59
Figura 21: Atividade fibrinogenolítica da BjussuMP-I: Variação do tempo.....	60
Figura 22: Atividade fibrinogenolítica da BjussuMP-I: Variação do pH.....	61
Figura 23: Atividade fibrinogenolítica da BjussuMP-I: Variação da temperatura.....	62

Figura 24: Atividade fibrinogenolítica da BjussuMP-I: Influência de íons.....	63
Figura 25: Atividade fibrinogenolítica da BjussuMP-I: Influência de inibidores.....	64
Figura 26: Atividade fibrinolítica da BjussuMP-I.....	65
Figura 27: Efeito da BjussuMP-I sobre plaquetas.....	66
Figura 28: Atividade bactericida da BjussuMP-I.....	68
Figura 29: Inibição da atividade hemorrágica da BjussuMP-I pelo diterpenóide de <i>Bacharis trimera</i> (Bt-CD).....	69
Figura 30: Inibição da atividade proteolítica da BjussuMP-I pelo diterpenóide de <i>Bacharis trimera</i> (Bt-CD).....	70
Figura 31: inibição da atividade hemorrágica da BjussuMP-I pelo extrato aquoso de <i>Pentaclethra macroloba</i> (Epema).....	71
Figura 32: Reatividade cruzada com anticorpos de <i>B. neuwiedi</i>	73
Figura 33: Seqüência do cDNA e de aminoácidos deduzidos da BjussuMP-I.....	75
Figura 34: Comparação da seqüência de aminoácidos da BjussuMP-I com outras metaloproteases.....	77

Lista de Tabelas

Tabela I: Rendimento da purificação da BjussuMP-I.....	40
Tabela II: Composição em aminoácidos da BjussuMP-I.....	74

Lista de Abreviaturas e Siglas

aa: aminoácido

AcN: acetonitrila

AMBIC: bicarbonato de amônio

ATCC 29648: Linhagem celular de *Escherichia coli*

ATCC 25923: Linhagem celular de *Staphylococcus aureus*

ATZ: aminoacilanilinothiazolinona

BJ: *Bothrops jararacussu*

BjussuMP-I: primeira metaloprotease de *Bothrops jararacussu*

BSA: albumina de soro bovina

BthA-I-PLA₂: fosfolipase isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*

BthTX-I: bothropstoxina I

C18: resina cromatográfica contendo 18 átomos de carbonos ligados à matriz

CK: creatina-cinase

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CQP: centro de química de proteínas

DHM: dose hemorrágica mínima

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

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

MP: metaloprotease

NaAc: acetato de sódio

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: solução salina tamponada em fosfato

PITC: fenilisotiocianato

PLA₂: fosfolipase

pmoL: picomol

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

PRP: plasma rico em plaquetas

PTC: feniltiocianato

PTH: aminoacilfeniltio-hidantoína

PVDF: fluoreto de polivinilideno

RGD: seqüência de aa arginina-glicina-ácido aspártico

SD: desvio padrão

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

SP: serinoprotease

TCA: ácido tricloroacético

TEA: trietilamina

TFA: ácido trifluoracético

Tris: tris hidroximetilaminometano

UT: unidades totais de atividade enzimática

RESUMO

Mazzi, M. V. **Caracterização funcional e estrutural de uma metaloprotease hemorrágica isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu***. 2005. 142 p. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Neste trabalho descrevemos o isolamento, a caracterização funcional e estrutural de uma metaloprotease hemorrágica, denominada BjussuMP-I. A proteína foi isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu* por combinação de dois passos cromatográficos, utilizando filtração molecular em Sephacryl S-200, equilibrada em tampão Tris-HCl (0,01 M, pH 7,0) seguida de cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose CL-4B, equilibrada em tampão Tris-HCl (0,01 M, pH 7,6 mais NaCl 4 M) e eluída com gradiente de NaCl (4-0 M) a 25°C no mesmo tampão. BjussuMP-I é uma proteína com massa molecular de 60 kDa e $pI \cong 5,6$, a qual induziu hemorragia após injeção intradérmica em camundongos, com uma dose hemorrágica mínima (DHM) de 4,5 µg. A atividade hemorrágica da BjussuMP-I foi totalmente inibida após incubação com um agente quelante (EDTA), confirmando a dependência de metal da enzima para esse efeito. BjussuMP-I possui atividade proteolítica sobre a caseína e fibrinogênio e nenhum efeito sobre a gelatina. Por outro lado, demonstrou alta especificidade pela cadeia α do fibrinogênio enquanto que a cadeia β somente foi hidrolisada na presença de altas concentrações da metaloprotease. A protease foi ativa sobre o fibrinogênio em pH neutro e alcalino e inativada a 75 °C. A dependência de metal da enzima foi demonstrada pela inibição exercida por EDTA, EGTA e 1,10 fenantrolina. Verificou-se uma inibição parcial pelo β -mercaptoetanol e PMSF, enquanto que leupeptina e aprotinina não afetaram a atividade fibrinogenolítica. A enzima foi ativada na presença de íons Ca^{++} e Mg^{++} , sendo inibida por Mn^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Co^{++} e Ni^{++} . Além disso, baixas concentrações da enzima produziram lise no coágulo de fibrina. BjussuMP-I também demonstrou inibição da

agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP e atividade bactericida sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Verificou-se que as atividades hemorrágica e proteolítica da BjussuMP-I foram neutralizadas pelo diterpenóide clerodane (Bt-CD) de *Bacharis trimera*. Também se observou uma inibição total do efeito hemorrágico, utilizando o extrato aquoso de *Pentaclethra macroloba* (EPema). A enzima foi reconhecida por anticorpos antineuwiedase, com uma reação de identidade imunológica parcial. A sequência completa do cDNA da BjussuMP-I com 1540 pb codificou para uma proteína de 547 resíduos de aminoácidos, que conservou os domínios comuns a metaloproteases hemorrágicas de alto peso molecular da classe PIII: (i) pré-pró-peptídeo, (ii) metaloprotease, (iii) disintegrina-símile e (iv) domínio rico em cisteína.

Palavras-chave: 1. Metaloprotease. 2. Atividade hemorrágica e proteolítica. 3. Peçonha de serpentes. 4. *Bothrops jararacussu*.

ABSTRACT

Mazzi, M. V. **Functional and structural characterization of a hemorrhagic metalloprotease isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom.** 2005. 142 p. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

In this study the isolation, functional and structural characterization of a hemorrhagic metalloprotease, named BjussuMP-I is reported. The protein was isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom by a combination of two chromatographic steps, using gel filtration on Sephacryl S-200 (0.01 M Tris-HCl, pH7.6 buffer) and Phenyl-Sepharose CL-4B chromatography (0.01 M Tris-HCl plus 4 M NaCl, pH7.6 buffer) followed by a concentration gradient from 4 to 0 M NaCl at 25°C in the same buffer. BjussuMP-I is a 60 kDa protein with a $pI \cong 5.6$, which induced hemorrhage after intradermal injection in mice with a minimum hemorrhagic dose (MHD) of 4.5 μ g. The hemorrhagic activity of BjussuMP-I was totally abolished after incubation with a chelating agent (EDTA), corroborating the metal-dependence of this effect. BjussuMP-I shows proteolytic activity on casein, collagen and fibrinogen, although no effect on gelatin was observed. In addition, it presented a high specificity toward the α -chain of fibrinogen, while the β -chain was only hydrolyzed at high concentrations of the metalloprotease. The protease was active against fibrinogen in neutral and alkaline pH and was inactivated at 75°C. The metal dependence of the enzyme was confirmed through inhibition by EDTA, EGTA and 1,10 phenantroline. A partial inhibition was observed with β -mercaptoethanol and PMSF, while leupeptin and aprotinin did not inhibit the fibrinogenolytic activity. The enzyme was active in the presence of Ca^{++} and Mg^{++} and it was inhibited by Mn^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Co^{++} and Ni^{++} . In addition, low concentrations of the enzyme presented lyses in fibrin plate after 12 h of incubation. BjussuMP-I also displayed inhibitory effect on collagen- and ADP-stimulated platelet aggregation, as well as bactericidal

activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. It was reported that both hemorrhagic and proteolytic activities of BjussuMP-I were neutralized by the clerodane diterpenoide (Bt-CD) from *Bacharis trimera*. Full inhibition of hemorrhage was also observed by using aqueous extract from *Pentaclethra macroloba* (EPema). The enzyme was recognized by anti-neuwiedase antibodies in a reaction of partial immunologic identity. The complete cDNA sequence of BjussuMP-I with 1540 pb encoded open reading frames of 547 amino acid residues which conserved the common domains of P-III high molecular weight hemorrhagic metalloproteases: (i) pre-pro-peptide, (ii) metalloprotease, (iii) disintegrin-like and (iv) rich cysteine domain.

Keywords: 1. Metalloprotease. 2. Hemorrhagic and proteolytic activity. 3. Snake Venom. 4. *Bothrops jararacussu*.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1 Proteases do Veneno: Serinoproteases e Metaloproteases.....	02
1.1.1 Serinoproteases (SPs).....	02
1.1.2 Metaloproteases (MPs): Aspectos Funcionais e Estruturais.....	03
 2. Objetivos.....	14
 3. Material.....	15
 4. Métodos	17
4.1 Isolamento e Caracterização Bioquímica da Metaloprotease.....	17
4.1.1 Isolamento da metaloprotease do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	17
4.1.1.1 Filtração molecular em gel de Sephacryl S-200.....	17
4.1.1.2 Cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose.....	17
4.1.1.3 Cromatografia de alta eficiência em fase reversa (HPLC-RP).....	18
4.1.2 Determinação quantitativa de proteína.....	18
4.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	18
4.1.4 Determinação da atividade proteolítica sobre.....	19
4.1.4.1 Caseína.....	19
4.1.4.2 Gelatina.....	20
4.1.4.3 Fibrinogênio.....	21
4.1.4.4 Fibrina.....	22
4.1.4.5 Colágeno.....	22
4.1.4.5 Efeito de Inibidores Sintéticos.....	23
 4.2 Estudo dos Efeitos Tóxicos da Metaloprotease.....	24
4.2.1 Atividade hemorrágica.....	24
4.2.2 Atividade edematogênica.....	25
4.2.3 Atividade miotóxica.....	25
4.2.4 Atividade anticoagulante.....	26

4.3 Estudo dos Efeitos Farmacológicos e Imunoquímicos da Metaloprotease.....	26
4.3.1 Efeito sobre plaquetas.....	26
4.3.2 Atividade bactericida.....	27
4.3.3 Ensaio imunoenzimático.....	28
4.4 Efeito de Inibidores Naturais sobre a Metaloprotease.....	29
4.4.1 Inibição da Atividade hemorrágica e proteolítica da BjussuMP-I pelo diterpenóide clerodano de <i>Baccharis trimera</i> (Asteraceae).....	29
4.4.2 Inibição da Atividade hemorrágica da BjussuMP-I pelo Extrato Aquoso de <i>Pentaclethra macroloba</i> (EPema).....	30
4.5 Caracterização Estrutural da Metaloprotease.....	30
4.5.1 Determinação da composição em aminoácidos.....	30
4.5.2 Hidrólise.....	31
4.5.3 Derivação.....	32
4.5.4 Separação dos PTC-aa.....	33
4.5.5 Quantificação dos PTC-aa.....	34
4.5.6 Quantificação da Metaloprotease.....	34
4.6 Sequenciamento Automático da Metaloprotease.....	35
4.7 Clonagem e Sequenciamento do cDNA.....	35
5. Resultados.....	37
5.1 Isolamento e Caracterização Bioquímica da Metaloprotease.....	37
5.2 Caracterização Funcional da Metaloprotease.....	44
5.2.1 Avaliação da atividade hemorrágica.....	44
5.2.2 Avaliação das atividades edematogênica e miotóxica.....	51
5.2.3 Avaliação do efeito proteolítico sobre diferentes substratos.....	51
5.2.4 Efeito da metaloprotease sobre os componentes da coagulação.....	56

5.2.4.1 Avaliação da atividade anticoagulante.....	56
5.2.4.2 Avaliação da atividade sobre o fibrinogênio e fibrina.....	56
5.2.4.3 Avaliação do efeito sobre plaquetas.....	57
5.2.5 Avaliação do efeito bactericida da metaloprotease.....	67
5.3 Efeito de Inibidores Naturais sobre Metaloproteases	67
5.4 Ensaios Imunoenzimáticos	72
5.5 Caracterização Estrutural da Metaloprotease	72
5.5.1 Análise da composição em aminoácidos.....	72
5.5.2 Seqüenciamento completo da BjussuMP-I.....	72
6. Discussão	81
7. Conclusão	97
8. Referências Bibliográficas	99
9. Anexo	117

1. INTRODUÇÃO

Na história da civilização, as serpentes venenosas durante anos assumiram peculiaridades culturais. Na arte, na ciência e na religião representaram valores simbólicos envolvendo inúmeras crenças. Nas últimas cinco décadas de investigações sobre a bioquímica e farmacologia das peçonhas de serpentes, novos conceitos foram introduzidos. Atualmente, várias pesquisas demonstram uma grande diversidade funcional e estrutural de seus componentes, que são capazes de fornecer inúmeras informações biológicas, inseridas em várias áreas da saúde (BJARNASON; FOX, 1994; GUTIÉRREZ, 2002; PAL; GOMES; DASGUBTA, 2002).

As peçonhas de serpentes chamam atenção quanto às inúmeras propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais. Sob o ponto de vista químico, são constituídos, na sua grande maioria, por proteínas e peptídeos, que atuam por diferentes mecanismos na paralisia, morte e digestão da presa (MEBS, 2001).

As peçonhas da maioria das serpentes são constituídas por uma vasta e variada gama de toxinas as quais incluem: neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, proteínas que agem na hemostasia (proteases) e outros, incluindo desintegrinas e peptídeos potenciadores de bradicinina (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

Os compostos biologicamente ativos da peçonha de serpentes, incluindo o gênero *Bothrops*, possuem efeitos tóxicos relevantes no âmbito de saúde pública. Porém são muito utilizados no estudo de estruturas moleculares de receptores neuromusculares e contribuem na compreensão do sistema imunológico (LEE; TSENG, 1966; FAMBROUGH; HARTZELL, 1972; EGGERTSEN; FOHLMAN; SJÖQUIST, 1980; STOCKER, 1990).

1.1 Proteases do Veneno: Serinoproteases e Metaloproteases

A hemorragias local e sistêmica são as principais manifestações clínicas evidenciadas no envenenamento por serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalidae. Muitas toxinas que constituem o veneno de serpentes já foram totalmente isoladas e caracterizadas, as quais incluem proteases (metaloproteases e serinoproteases), miotoxinas (fosfolipases A_2), fosfomonoesterases, L-amino oxidases, acetilcolinesterases, nucleotidases, nucleosidases e desintegrinas (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

No envenenamento botrópico, a alteração do equilíbrio hemostático geralmente está relacionada à ação de proteases sobre diferentes fatores da cascata de coagulação, tais como o fibrinogênio ou fibrina (GASMI et al., 2000; DUNN; BROADY, 2001; TAKATSUKA et al., 2001). As proteases do veneno, classificadas em serinoproteases e metaloproteases, são os principais grupos de enzimas que podem levar ao desequilíbrio hemostático (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

1.1.1 Serinoproteases (SPs)

As SPs, assim como outros constituintes do veneno afetam o equilíbrio hemostático por diversos mecanismo. Algumas SPs, possuem propriedades coagulantes, degradando os fibrinopeptídeos A e/ou B do fibrinogênio. Esse processo torna o sangue incoagulável pela depleção do fibrinogênio, processo denominado defibrinogenação. A ativação/inibição seletiva de fatores envolvido na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise, também constituem outros mecanismos observados com várias SPs. (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

Fisiologicamente, esse mecanismo, denominado efeito trombina-símile, constitui uma etapa crítica da coagulação, onde serão iniciados, não somente a formação do coágulo de

fibrina, mas também a ativação do fator V, VIII e plaquetas, efeitos evidenciados com a maioria das SPs isoladas (OUYANG; TENG; CHEN, 1992).

A interação dessa classe de toxinas com a cascata da coagulação auxiliou no entendimento de novas correlações clínicas e farmacológicas com os sistemas biológicos (NIEWIAROWSKI et al., 1994; PEREZ et al., 2001). Cita-se como exemplo, as fibrinogenases α e β isoladas do veneno de *Trimeresurus microsquamatus* (OUYANG; TENG; CHEN, 1977) e *Crotalus atrox* (SAPRU; TU; BAILEY, 1983; NIKAI et al., 1985).

1.1.2 Metaloproteases (MPs): Aspectos Funcionais e Estruturais

As MPs são enzimas proteolíticas com importantes funções biológicas em seres procariotos e eucariotos, incluindo o homem. Isoladas do veneno de várias serpentes, são importantes objetos de estudo devido à complexidade funcional e estrutural. As serpentes do gênero *Bothrops*, importantes fontes desta classe de enzimas, recebem especial atenção em virtude dos aspectos clínicos e epidemiológicos (GUTIÉRREZ, 2002; BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

As MPs isoladas e caracterizadas da peçonha botrópica, embora não possuam propriedades letais, em conjunto com outras toxinas do veneno contribuem para o efeito tóxico. Responsáveis pela importante manifestação clínica do envenenamento, a hemorragia, essas toxinas podem interagir com diferentes fatores da cascata da coagulação (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

O efeito sobre os componentes da coagulação tais como o fibrinogênio, fibrina e/ou plaquetas, tem sido um dos mais prováveis mecanismos de ação das MPs (BRAUD; BON; WISNER, 2000; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). Assim, com algumas exceções, podem ser classificadas em α - ou β -fibrinogenases e, ao contrário das serinoproteases,

degradam preferencialmente a cadeia α do fibrinogênio e com menor intensidade a cadeia β (MARKLAND, 1991).

Desta classe, que geralmente são representadas por α -fibrinogenases de baixa e média massas moleculares (20.000 a 60.000 Da) foram inicialmente isoladas do veneno de serpentes das espécies, *Trimeresurus microsquamatus* (OUYANG; TENG; CHEN, 1977), *Crotalus atrox* (PANDYA; BUDZYNSK, 1984), *Bothrops jararaca* (MARUYAMA et al., 1992a), *Bothrops moojeni* (SERRANO et al., 1993; SERRANO; SAMPAIO; MANDELBAUM, 1993), *Bothrops asper* (GUTIÉRRES et al., 1994), *Bothrops jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000), *Bothrops neuwiedi* (RODRIGUES et al., 2000) e *Lachesis muta muta* (ESTEVÃO-COSTA et al., 2000 e SANCHEZ et al., 2000).

A identificação dos princípios hemorrágicos iniciou-se com o estudo do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Assakura et al. (1985 e 1986), isolaram e caracterizaram duas metaloproteases do veneno de *B. moojeni* e *B. jararaca*, ambas com baixa atividade hemorrágica e massa molecular. Da espécie *B. jararaca*, também foram isoladas duas outras metaloproteases, porém hemorrágicas, denominadas HF-2 e HF-3, com 50 e 62 kDa, respectivamente (ASSAKURA et al., 1986).

As toxinas hemorrágicas de *B. neuwiedi*, de altas massas moleculares, denominadas NHF-a e NHF-b, foram isoladas e funcionalmente caracterizadas (MANDELBAUM; ASSAKURA; REICHL, 1984). Essas enzimas demonstraram importantes propriedades funcionais, chamando a atenção, principalmente para os efeitos proteolíticos sobre diferentes substratos naturais, como por exemplo, a caseína, fibrina e o fibrinogênio. Para estudar tais mecanismos, SERRANO et al. (1993) isolaram e caracterizaram uma metaloprotease não hemorrágica do veneno de *B. moojeni*.

A maioria dos processos de isolamento de metaloproteases utiliza métodos clássicos de cromatografia, envolvendo técnicas de exclusão molecular, troca iônica e cromatografia

líquida de alta performance (CLAE). Essas técnicas foram bastante utilizadas para purificar metaloproteases do veneno de *B. jararaca*, *B. asper* e *B. neuwiedi*, das quais obteve-se proteases com baixa e alta atividade hemorrágica (REICHL, 1984; GUTIÉRREZ et al., 1995; MANDELBAUM; ASSAKURA; MARUYAMA et al., 1992a; FRANCESCHI et al., 2000).

Para o isolamento de proteases em geral, metodologias tais como cromatografias de bioafinidade e de interação hidrofóbica demonstram alta seletividade para esses compostos (GRANET; BERTRAND, 1996). Considerando essa característica, alguns trabalhos sobre purificação de toxinas hemorrágicas de serpentes do gênero *Bothrops* descrevem a utilização de técnicas baseadas na hidrofobicidade das moléculas.

BORKOW e GUTIÉRREZ (1993) utilizaram o método de purificação por interação hidrofóbica, associado com técnicas de cromatografia exclusão molecular e troca iônica, para o isolamento de uma metaloprotease hemorrágica de 64 kDa do veneno de *B. asper*. Desse mesmo gênero, uma MP de 55 kDa com propriedades fibrinolíticas foi isolada por SOUZA et al. (2000), utilizando o mesmo princípio, a hidrofobicidade. Ambos procedimentos resultaram na obtenção de amostras puras e homogêneas.

A hemorragia ocorre, principalmente devido ao complexo mecanismo de ação das MPs, a qual interage com diferentes sítios de ação (BJARNASON; FOX, 1994; KAMIGUTI et al., 1996; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). O endotélio vascular, constituído por células especializadas na manutenção da fluidez e equilíbrio hemostático, é descrito também como um dos principais sítios de ação das MPs de veneno. Estas afetam as células endoteliais, produzindo reações inflamatórias nas junções intercelulares sem alterar a morfologia celular, processo denominado hemorragia “per diapedeses” (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; VICTOR; HINSBERGH, 2001).

Outros mecanismos descritos com MPs do veneno de serpentes envolvem o efeito proteolítico sobre o colágeno, laminina e fibronectina, principais componentes da matriz

extracelular, os quais estão envolvidos em inúmeros processos de adesão, remodelagem e integridade tecidual dos capilares e vênulas (HAYASHI et al., 1998; De CLERCK, 2000; BELLON; MARTINY; ROBINET, 2004). A ação das MPs do veneno de serpentes sobre a integridade desses constituintes desencadeia o desenvolvimento de “gaps”, (fissuras teciduais) pelos quais os componentes do sangue extravasam; processo denominado hemorragia “per rhexis” (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ et al., 2005).

A complexidade do mecanismo de ação hemorrágico, envolvendo o efeito proteolítico das MPs sobre diferentes substratos foi inicialmente estudada com duas metaloproteases hemorrágicas isoladas do veneno de *B. jararaca*, denominadas Jararafibrase I e II (MARUYAMA et al. (1992b), as quais demonstraram, juntamente com as propriedades fibrinolíticas, a degradação do colágeno (tipo I e IV), laminina e fibronectina. Os mesmos efeitos também foram observados com a BaH₄, uma metaloprotease hemorrágica de 69 kDa, isolada do veneno de *B. asper* (FRANCESCHI et al., 2000).

As MPs hemorrágicas e não hemorrágicas são sintetizadas na glândula do veneno como proteínas multidomínios, incluindo o domínio pró-enzima e um domínio catalítico protease zinco-dependente, que também se conservam na molécula. Os processamentos proteolíticos dessas enzimas originam isoformas biologicamente ativas (GUTIÉRREZ, 2002).

A classificação das MPs hemorrágicas de acordo com seus domínios fornece informações essenciais para compreender os mecanismos de ação dessas enzimas. Assim, as MPs são estruturalmente classificadas em quatro grupos (KINI; EVANS, 1992; BJARNASON; FOX, 1994): classe P I (possuem unicamente o domínio metaloprotease, caracterizada por uma sequência de resíduos aminoácidos (HEXXHXXGXXH) que se conserva); classe P II (possuem domínio catalítico e domínio tipo desintegrina); classe P III (domínio catalítico, domínio tipo desintegrina e rico em cisteína) e classe P IV, que compreendem as enzimas com duas subunidades, uma constituída por todos os domínios da

classe P III e a outra, representada pelo o domínio lectina. Este último modelo estrutural foi inicialmente proposto por KINI e EVANS (1992), porém até o momento, nenhuma MP está descrita com tais características, ou seja, contendo um domínio lectina na região do N-terminal (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática dos domínios de uma metaloprotease (KINI; EVANS, 1992), originados por proteólise (P): A, suposta região contendo domínio lectina no N-terminal; B, região rica em cisteína; C, domínio metaloprotease; D, domínio desintegrina, contendo a seqüência RGD e , região rica em cisteína na região C-terminal.

Através do estudo do cDNA de cinco toxinas isoladas do veneno de *Crotalus atrox*, JIANG e BOND (1992), propuseram a classificação das MPs em 4 subfamílias, assim denominadas: I-Termolisina; II-astacina; III-metaloprotease do veneno de serpentes e IV-matrixina (MMP).

Em virtude da intensidade do efeito hemorrágico e as características estruturais das diferentes MPs, há indícios que exista uma relação entre o tamanho molecular e o potencial hemorrágico. As do tipo P I incluem as proteínas de baixo peso molecular e atividade hemorrágica baixa. Essas enzimas são constituídas por pré e pró-domínios e domínio

metalo-protease (HEXXHXXGXXH). Citam-se como exemplo dessa classe a Atrolisina e seus subtipos isolados do veneno de *Crotalus atrox* (BJARNASON; FOX, 1994).

As classes P II e III representam proteínas de médios e altos pesos moleculares, respectivamente, e o processamento proteolítico da enzima origina o domínio desintegrina, que são denominadas “Desintegrin-Like” e o domínio rico em cisteína. Essas classes são representadas por toxinas altamente hemorrágicas. A classe P IV representa as proteínas de alto peso molecular e baixa atividade hemorrágica (BJARNASON; FOX, 1994).

Algumas divergências foram observadas com relação à classificação das proteases de serpentes, baseando-se somente nas propriedades químicas. Assim, BJARNASON e FOX (1994) também sugeriram um segundo critério para classificar as MPs. Apesar de a massa molecular ser um parâmetro comum, as MPs também foram agrupadas de acordo com o potencial hemorrágico, ou seja, pela dose hemorrágica mínima (DHM).

Dessa forma, com algumas exceções, as toxinas altamente hemorrágicas (DHM=0,01-0,7 µg/g) pertencem à classe P III, enquanto que as toxinas com DHM entre 0,2-1,4 µg/g e 0,3-10 µg/g constituem as classes P II e P I, respectivamente, que são toxinas com baixa atividade hemorrágica. Esses parâmetros, juntamente com as características estruturais já mencionadas, não necessariamente denotam a potência hemorrágica. Pois, há MPs da classe P I com propriedades hemorrágicas, como por exemplo, Atrolisin A e C (*B. atrox*), Bap I (*Bothrops asper*), e algumas MPs da classe P III tais como Catrocollastin de *Crotalus atrox*, que não induzem hemorragia (FOX; SERRANO, 2005; LORÍA et al., 2003; SILVA et al., 2003).

STÖCKER et al. (1995), compararam estruturalmente diferentes zinco-peptidases e sugeriram uma nova classificação para algumas MPs. Incluindo as fibrinogenases do veneno de serpentes, as metaloenzimas dependentes de Zn^{++} foram agrupadas em uma única família, as “Metzincins”. As enzimas que compõem este grupo possuem uma característica comum

quanto aos aminoácidos ligados ao Zn^{++} (HEXXHXXGXXH) que se conservam, e a metionina constituindo a base do sítio ativo da molécula, como pode ser observado na Figura 2.

O íon Zn^{++} , elemento essencial para a atividade da enzima, confere maior estabilidade à mesma, impedindo mudanças conformacionais na estrutura com conseqüente perda de atividade (GOMIS-RUTH; FRANS-XAVER, 1993; MOURA-da-SILVA et al., 2003; XU et al., 2004).

Figura 2: Modelos estruturais de duas “Metzincins” modificado de STÖCKER et al., 1995. O domínio catalítico das proteases está representado pelo zinco ligado à seqüência que se conserva na molécula HEXXHXXGXXH, onde His são resíduos de histidina e a metionina na base do sítio ativo.

Atualmente, somente algumas toxinas hemorrágicas da classe P I estão totalmente caracterizadas quanto aos aspectos estruturais. Cita-se a Adamalysin II de *Crotalus adamanteus*, Atrolysin C, isolada de *Crotalus atrox*, uma protease (H2) de *Trimeresurus flavoviridis*, Acutolysin obtida de *Agkistrodon acutus* e Bap I isolada de *Bothrops asper*, cujas

estruturas em cristais revelaram a presença de ligações dissulfeto conservadas no domínio metaloprotease (FOX; SERRANO, 2005).

De modo geral, as MPs hemorrágicas e não hemorrágicas possuem homologia estrutural altamente conservada. Entretanto, uma análise comparativa entre diferentes classes de MPs mostra que há alterações estruturais no domínio catalítico e na superfície da molécula, os quais contribuem para o efeito hemorrágico. Assim, têm sido reportadas modificações pós-traducionais, como por exemplo, N-glicosilação da região C-terminal e resíduos de ácido aspártico (Asp 148) e serina (Ser 176) conservados no sítio catalítico, os quais podem potencializar a hemorragia (RAMOS; SELISTRE-de-ARAÚJO, 2004).

É interessante enfatizar que o domínio desintegrina da maioria das MPs das classes PII e P III, é um produto da autoproteólise dessas toxinas. Originalmente definidas como peptídeos de baixa massa molecular (8-30 kDa), são estruturas constituídas por uma sequência RGD/ECD (Arg-Gly-Asp) que reconhecem integrinas localizadas em todos os tipos de células (HYNES, 1987; SHEU; HUANG, 1994; TANJONI et al., 2003a e 2003b; WARD et al., 1996). A interação e os efeitos biológicos desses domínios envolvem dois mecanismos: i) direcionamento das MPs a uma célula específica contendo integrinas e ii) bloqueio da ação de ligantes, como por exemplo, colágeno, fibrinogênio e fibronectina (FOX; SERRANO, 2005).

Constituindo as MDC-MPs (metaloproteases com domínio desintegrina e rico em cisteína) as MPs hemorrágicas revelam significantes similaridades estruturais e funcionais com as ADAMs (uma metaloprotease e uma desintegrina), as quais estão envolvidas com mecanismos de sinalização celular. Assim, o reconhecimento seletivo de receptores celulares pelo domínio desintegrina, presentes na estrutura de MPs hemorrágicas, indicam que esses compostos podem ser utilizados no estudo da fisiologia celular e para compreender a função de proteínas similares (KAMIGUTI, ZUZEL, THEAKSTON, 1998)

A caracterização estrutural de toxinas isoladas do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* determinou não somente a existência de homologia entre MPs, mas também uma provável seletividade das MPs pelas integrinas (SCARBOROUGH et al., 1993). Para complementar esses estudos, FRANCISCHET et al. (1998) compararam várias peçonhas do gênero *Bothrops*, inclusive da espécie *B. jararacussu*, e sugeriram a existência de toxinas hemorrágicas no veneno bruto, com prováveis efeitos sobre as plaquetas.

PAINE et al. (1992) isolaram e caracterizaram uma metaloprotease da classe PIII hemorrágica, denominada Jararagina. Os mecanismos de inibição de agregação plaquetária foram bastante estudados utilizando essa toxina (KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996; KAMIGUTI et al, 1997a e 1997b).

As MPs inibidoras de agregação plaquetária foram denominadas “desintegrina-like” e atualmente constituem um dos principais objetos de estudo de moduladores de adesão plaquetária. Interação especificamente com as plaquetas, via receptores glicoprotéicos $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ou $\alpha_2\beta_1$ (GP Iib-IIIa), induzindo o efeito anti-agregante (GOULD et al., 1990; ANDREWS; BERNDT, 2000; NIEWIAROWSKI, et al., 1994). Assim, as MPs hemorrágicas com domínio adicional (tipo desintegrina) foram isoladas do veneno de *B. alternatus* e *B. jararaca* demonstrando significativa inibição de agregação plaquetária e adesão celular (SOUZA et al., 2000; CORRÊA et al., 2002).

COMINETTI et al. (2003) isolaram e caracterizaram uma metaloprotease dimérica de 130 kDa do veneno de *B. alternatus* e demonstraram que a enzima inibiu a agregação de plaquetas e adesão celular via receptor $\alpha_5\beta_1$. Efeitos parecidos foram observados com a Basparina A, uma MP coagulante isolada do veneno de *B. asper* (LORIA et al., 2003). Recentemente, uma desintegrina contendo domínio ECD no lugar da sequência RGD, isolada de *B. alternatus*, induziu quimiotaxia de neutrófilos (MARIANO et al., 2003).

Os estudos que envolvem a relação estrutura/função de MPs da classe P II e P III mostram que a presença desses domínios adicionais (tipo desintegrina) contribuem para o efeito hemorrágico das MPs. Os ensaios imunoquímicos com anticorpos monoclonais da Jararagina identificaram na toxina sítios específicos (epítomos) contidos nos domínios catalítico e desintegrina-like/região rica em cisteína, relacionados ao efeito hemorrágico (TANJONI et al., 2003a). Em outro estudo, esses anticorpos foram especificamente reativos sobre várias peçonhas de serpentes, incluindo o da espécie *B. jararacussu*, confirmando uma conservação estrutural entre as metaloproteases no veneno de serpentes com propriedades proteolítica e hemorrágica (TANJONI et al., 2003b).

As enzimas com propriedades proteolíticas do veneno de serpentes têm demonstrado crescente interesse devido à grande aplicação que possuem. Entre as proteases, as MPs têm chamado a atenção quanto às suas propriedades estruturais e funcionais (GUTIÉRREZ, 2002; MOURA-da-SILVA et al., 2003). Assim, vários estudos empenham-se na elucidação de novas funções que estas enzimas desencadeiam em sistemas biológicos e como as características estruturais interferem em tais mecanismos (POINDEXTER et al., 1999; THOMAS; LEWIS; SPEIGHT, 1999; SPINALE et al., 2000).

Algumas toxinas isoladas, como por exemplo, L-aminoácido oxidase e PLA₂s, têm demonstrado eficiente propriedades quimioterápicas contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dentre outros (BAILEY; WILCE, 2001). Uma L-aminoácido oxidase isolada de *B. alternatus* demonstrou relevantes propriedades antibióticas sobre *E. coli* e *S. aureus* (STÁBELI et al., 2004).

As MPs dos venenos de serpentes, que na maioria das vezes não demonstram resistência a inibidores fisiológicos, atualmente são importantes ferramentas para investigar os mecanismos de coagulação do sangue. Por outro lado, podem ser interessantes modelos

moleculares para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos no tratamento do envenenamento e de algumas patologias, como por exemplo, o câncer e várias outras doenças degenerativas. (BRAUD; BON; WISNER, 2000; HANDLEY; HUGHES, 1997; TRENTO et al., 2001).

Apesar de a peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* ser uma fonte abundante de toxinas com propriedades tóxicas e farmacológicas, algumas já conhecidas, pouco se sabe sobre as MPs da espécie *B. jararacussu*. Atualmente, mais de 100 MPs, incluindo as isoladas de serpentes, são estrutural e funcionalmente relacionadas (STÖCKER et al., 1995). Nesse sentido, este trabalho demonstra que muitas características sobre essas enzimas precisam ser elucidadas quanto aos aspectos funcionais e estruturais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Objetivou-se o isolamento, caracterização funcional e estrutural de uma metaloprotease hemorrágica de alto peso molecular do veneno de *B. jararacussu*.

2.2 Específico

2.2.1. Padronizar a metodologia para o isolamento de uma metaloprotease hemorrágica do veneno de *B. jararacussu* pela associação de métodos cromatográficos de exclusão molecular em gel de Sephacryl S-200, interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose e cromatografia líquida de alta performance (CLAE).

2.2.2. Caracterização bioquímica da metaloprotease: Determinação da massa molecular, ponto isoelétrico, avaliação do grau de pureza e efeito de inibidores: EDTA, EGTA, PMSF, 1,10-fenantrolina, leupeptina, aprotinina e β mercaptoetanol.

2.2.3. Caracterização funcional da metaloprotease: Determinação das atividades hemorrágica, edematogênica, miotóxica, anticoagulante, avaliação do efeito sobre plaquetas, determinação da atividade enzimática sobre diferentes substratos (gelatina, colágeno, caseína, fibrinogênio e fibrina) e avaliar o efeito bactericida.

2.2.4. Caracterização estrutural da metaloprotease: Determinação da composição, sequenciamento direto de aminoácidos e determinação da estrutura primária por cDNA.

3. MATERIAL

3.1 Animais

Para estudo das atividades, hemorrágica, edematogênica e miotóxica, utilizaram-se camundongos machos, linhagem Suíça, pesando entre 18 a 22 gramas. Os animais foram adquiridos do Biotério Central do campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo-USP e foram mantidos em local e condições adequados.

3.2 Veneno

Foi utilizado veneno bruto de *B. jararacussu* adquirido do Instituto Butantan de São Paulo.

3.3 Reagentes

- Ácido trifluoracético-TFA (Synth)
- Acrilamida/Bisacrilamida (Sigma Chem. Co. USA)
- Aprotinina (Sigma Chem. Co. USA)
- Azul de Bromofenol (Merck)
- Azul de Comassie R-250 (Pharmacia Biotech)
- Ácido etilenodiaminotetracético-EDTA (Reagen)
- EGTA (Reagen)
- Fibrinogênio bovino (Sigma Chem. Co.USA)
- Gelatina (Sigma Chem. Co.USA)
- Leupeptina (Sigma Chem. Co.USA)
- Padrões de Massa Molecular: Fosforilase b (94.000 Da), Albumina de soro bovino (67.000 Da), Ovoalbumina (43.000 Da), Anidrase carbônica (30.000 Da), Inibidor de tripsina de soja (20.100 Da) e α -lactalbumina (14.400 Da), Pharmacia Biotech.
- “Phenylmethilsulfonyl Fluoride”-PMSF (Sigma Chem. Co.USA)

-Resinas cromatográficas:

-Sephacryl S-200 (Pharmacia Biotech)

-Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech)

-Dodecilsulfato de sódio-SDS (Merck)

-N, N, N', N'-Tetrametiletenodiamina-TEMED (Sigma Chem. Co.USA)

- α -caseína (Sigma Chem. Co.USA)

- β -mercaptoetanol (Merck)

-Trombina bovina (purificada e fornecida pelo Prof. Dr. José R. Giglio-FMRP-USP).

Todos os reagentes utilizados no sequenciamento e determinação da composição em aminoácidos foram de grau analítico obtidos da Pierce, Merck ou Sigma.

4.MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

4.1.1 Isolamento da MP do Veneno Bruto de *Bothrops jararacussu*

4.1.1.1 Filtração molecular em gel de Sephacryl S-200

O veneno bruto de *B. jararacussu* (300 mg) foi dissolvido em 3 mL de tampão Tris-HCl (0,01 M, pH 7,0) mais CaCl_2 (0,02 M), centrifugado a 5000 x *g* e posteriormente aplicado em coluna (120 x 2,2 cm) contendo gel de Sephacryl S-200, previamente equilibrada à temperatura ambiente e eluída com o mesmo tampão. Foram coletados 3 mL/tubo num fluxo de 30 mL/h. A cromatografia foi acompanhada pela leitura da absorbância em 280 nm e atividade hemorrágica, utilizando-se o ensaio biológico (item 4.2.1). As frações foram reunidas, liofilizadas e armazenadas em freezer a -10°C.

4.1.1.2 Cromatografia de Interação Hidrofóbica Phenyl Sepharose CL-4B

A fração liofilizada (100 mg/mL) com atividade proteolítica e/ou hemorrágica obtida no item 4.1.1.1 foi resuspendida em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,6 e NaCl 4 M, centrifugada a 5000 x *g* e aplicada em coluna (5,9 x 1,5 cm) contendo Phenyl-Sepharose CL-4B, previamente preparada e equilibrada à temperatura ambiente com o mesmo tampão. Na cromatografia foram coletados 2,5 mL/tubo, num fluxo de 50 mL/h, com gradiente decrescente, gradativo e descontínuo de NaCl (4-0 M) em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,6. As frações resultantes foram delimitadas e avaliadas quanto ao grau de pureza e caracterização funcional.

4.1.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)

A fração hemorrágica (1mg/mL) foi cromatografada em sistema de fase reversa, utilizando coluna Shimadzu SPD C-18 (4,6 x 25 mm) contendo resina octadecil sulfonila. Cerca de 1mg da fração hemorrágica foi dissolvida em 200 µL de TFA 0,1% (solvente A) e eluída com gradiente linear de 40% do solvente B-(Acetonitrila:TFA, 80%:0,09%) a um fluxo de 1mL/min, durante 50 min. A absorbância foi monitorada a 280 nm.

4.1.2 Determinação Quantitativa de Proteína

A quantificação da proteína foi realizada pelo método do microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964). As amostras foram convenientemente diluídas e a dosagem foi realizada utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

4.1.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes

As eletroforeses em condições desnaturantes (SDS) foram realizadas segundo a técnica descrita por LAEMMLI (1970). No sistema eletroforético foi utilizado gel de concentração igual ou superior a 5% contendo bis-acrilamida:acrilamida: (0,8:30, m/v) em Tris-HCl a 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 0,1% e gel de separação igual ou inferior a 12% contendo bis-acrilamida:acrilamida (0,8:30, m/v) em Tris-HCl 2,0 M, pH 8,8 e SDS 0,1%. Os géis foram polymerizados em placas de vidro (10,5 x 10 mm), as quais foram acopladas em reservatório contendo tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3. Avaliou-se concentrações variadas do veneno bruto (2,0-4,0 µg/µL) e amostras isoladas das cromatografias (2,0-4,0 µg/µL), como critério de pureza e determinação da massa molecular. As amostras foram dissolvidas em tampão

Tris-HCl a 0,0625 M, pH 6,8 contendo glicerol a 10%, β -mercaptoetanol 5% (v/v), SDS a 2% e azul de bromofenol a 0,001%. As soluções foram aquecidas a 100°C por 5 min e aplicadas nos poços, num volume final de 15 μ L. Os padrões de massa molecular utilizados foram: fosforilase b (94.000 Da), soro albumina bovina (67.000 Da), ovoalbumina (43.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina de soja (20.100 Da) e α -lactalbumina (14.400 Da).

A eletroforese foi realizada em tampão Tris-glicina (0,1 M) e SDS a 0,1% pH 8,3, utilizando uma fonte de energia programada com uma corrente de 10 mA constantes do início ao fim da corrida. Foi utilizado azul de bromofenol como indicador. As proteínas foram coradas com uma solução de Azul de Coomassie R-250 em água e metanol, na proporção de 1:1 (v/v). O gel foi descorado com uma solução de ácido acético a 10 %, até a visualização das bandas de proteínas.

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

4.1.4 Determinação da Atividade Enzimática

4.1.4.1 Atividade Proteolítica sobre a Caseína

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita por RODRIGUES et al. (2000) com algumas modificações. Para o teste, 5,0 μ g do veneno bruto e da metaloprotease isolada de *B. jararacussu* foram incubadas com 0,75 mL de solução de caseína (1%) em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,6, por 15 min a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de TCA (30%) e mantida por 30 minutos a temperatura ambiente e posteriormente submetida à centrifugação (1500 x g/5min). A atividade

proteolítica foi estimada pela leitura da absorbância do sobrenadante a 280 nm. Uma unidade de atividade caseinolítica foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento na absorbância de 0,001 unidades/minuto.

4.1.4.2 Atividade Proteolítica sobre a Gelatina

A atividade proteolítica da BjussuMP-I sobre a gelatina foi realizada segundo a metodologia descrita por LEBER e BALKWILL (1997), com algumas modificações. No sistema eletroforético foi utilizado um gel de concentração igual ou superior a 5% contendo bis-acrilamida:acrilamida (0,8:30, m/v) em Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 0,1% e um gel de separação igual ou inferior a 12% contendo bis-acrilamida:acrilamida (0,8:30, m/v) copolimerizado com gelatina a 3% em Tris-HCl 2,0 M, pH 8,8 e SDS a 0,1%. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo glicerol a 10%, SDS (2%) e azul de bromofenol 0,001%. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina 0,1 M pH 8,3, por 120 min a 10 mA e 100 V. Findo este tempo, o gel foi retirado das placas e submetido a três lavagens com Triton X-100 (2,5%) para retirada do SDS. Em seguida, o gel foi incubado em tampão Tris-HCl (0,01M, pH 7,6) por duas horas, a 37 °C. A atividade foi avaliada após a coloração do gel com Azul de Comassie R-250 a 0,2% (m/v) em água:metanol (1:1, v/v) por 10 min e descorado com ácido acético 10% (v/v). O efeito gelatinolítico foi visualizado através da revelação de bandas não coradas, indicando o efeito proteolítico da enzima.

4.1.4.3 Atividade Proteolítica sobre o Fibrinogênio

A atividade fibrinogenolítica foi avaliada segundo a metodologia descrita por RODRIGUES et al. (2000). Diferentes concentrações de metaloprotease isolada de *B. jararacussu* (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16 e 32 µg) foram incubadas com 10 µL de fibrinogênio bovino (2µg/µL PBS) a 37 °C por 2 horas. A reação foi interrompida com 10 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,5, contendo glicerol a 10% (v/v), β-mercaptoetanol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v) e azul de bromofenol a 0,05% (m/v). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% contendo bisacrilamida:acrilamida (0,8:30, m/v) em Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e SDS a 0,1%. A atividade fibrinogenolítica também consistiu em avaliar as variáveis pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0), temperatura (4, 37, 50, 75 e 100°C) e efeito de íons (Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Co^{++} e Ni^{++}). Após a determinação do tempo e concentração ótimos da enzima (4,0 µg e 30 min), incubou-se a metaloprotease em tampões com diferentes pHs, a 37°C, por 15 min: glicina-HCl (0,1 M, pH 2,5 e 3,5); acetato (0,10 M, pH 4,5 e 5,5); Tris-HCl (0,1 M, pH 7,0 e 8,0). Findo este tempo, avaliou-se a atividade sobre o fibrinogênio, de acordo com a metodologia descrita acima. Para avaliar o efeito da temperatura na atividade enzimática, a mistura de reação contendo metaloprotease (4,0 µg), mais fibrinogênio (2,0 µg/µL), no pH ótimo da enzima (7,0) foi incubada por 30 min em diferentes temperaturas e a atividade fibrinogenolítica determinada em gel de poliacrilamida, de acordo com a metodologia descrita acima. O efeito de íons na atividade enzimática foi avaliado primeiramente incubando-se por 15 min, 10 µL da mistura de reação contendo metaloprotease a 0,4 µg, com 10 µL das soluções dos referidos íons a 0,04 M. Findo este tempo, a mistura foi incubada com fibrinogênio (2,0 µg/µL PBS), no pH e temperatura ótimos da enzima (7,0 e 37°C) e em seguida verificou-se a atividade fibrinogenolítica em gel de poliacrilamida, de acordo com a metodologia descrita acima.

4.1.4.4 Atividade Proteolítica sobre a Fibrina

O ensaio de atividade fibrinolítica foi realizado de acordo com o método descrito por LEITÃO; POLIZELLO e ROTHCHILD (2000), incubando-se diferentes concentrações BjuMP-I em placas de Petri contendo fibrina. Primeiramente prepararam-se a placa de fibrina, homogeneizando volumes iguais de fibrinogênio bovino (0,3%, p/v) e agarose (0,95%, p/v), sendo que ambas soluções foram preparadas em tampão barbital 0,05 M, pH 4,6 contendo CaCl_2 a $166 \cdot 10^{-5}$ M, MgCl_2 a $68 \cdot 10^{-5}$ M e NaCl a $94 \cdot 10^{-4}$ M. A mistura (fibrinogênio-agarose) foi coagulada com 80 μL de uma solução contendo trombina bovina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As placas contendo o coágulo foram mantidas a 4°C e após 30 min, com auxílio de uma ponteira, um número adequado de pequenas cavidades (5 mm de diâmetro) foram feitos sobre o coágulo de fibrina. Para determinar a atividade fibrinolítica, alíquotas de 30 μL contendo diferentes concentrações da metaloprotease (3,0; 6,0; 15; 30; 60 e 120 μg) foram adicionadas em cada cavidade e em seguida a placa foi incubada por 24 h a 37 °C. A atividade fibrinolítica foi avaliada visualmente e quantificada pelos halos de lises produzidos, comparando-se com um controle positivo (veneno bruto de *Bothrops jararacussu*) e um controle negativo (PBS).

4.1.4.5 Atividade Proteolítica sobre o Colágeno

A atividade proteolítica sobre o colágeno foi avaliada segundo a metodologia descrita por MARUYAMA et al. (1992b) com algumas modificações. Diferentes concentrações de metaloprotease isolada de *B. jararacussu* (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16 e 32 μg) foram incubadas com 10 μL de colágeno tipo IV de placenta humana (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ PBS) a 37 °C por 2 horas. A reação foi interrompida com 10 μL 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% (p/v). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% contendo bisacrilamida:acrilamida (0,8:30, m/v) em Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e SDS a 0,1%. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-glicina (0,1 M) e SDS a 0,1% pH 8,3, utilizando uma fonte de energia programada com uma corrente de 10 mA constantes do início ao fim da corrida. Foi utilizado azul de bromofenol como indicador. As proteínas foram coradas com uma solução de Azul de Coomassie R-250 em água e metanol, na proporção de 1:1 (v/v). O gel foi descorado com uma solução de ácido acético a 10 %, até a visualização das bandas de proteínas.

4.1.4.6 Efeito de Inibidores Sintéticos

O efeito de inibidores sintéticos (EDTA, EGTA, PMSF, leupeptina, aprotinina, 1,10 fenantrolina e β -mercaptoetanol) sobre a metaloprotease foi avaliado segundo a metodologia descrita por RODRIGUES et al. (2000). Primeiramente incubaram-se a 10 μ L da mistura reacional contendo a metaloprotease (0,4 μ g) com 10 μ L dos respectivos inibidores a 0,02 M, por 15 minutos. Findo este tempo, a mistura foi incubada com 10 μ L do fibrinogênio (2 μ g/ μ L PBS), por 30 min. Determinou-se a atividade fibrinogenolítica em gel de poliacrilamida, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (item 4.1.4.3).

O efeito de inibição também foi avaliado neutralizando-se do efeito hemorrágico produzido pela metaloprotease com EDTA. Para o ensaio, duas doses hemorrágicas mínimas (2 DHM=9,0 μ g/g) da metaloprotease foram incubadas com EDTA 1mM/15 min e posteriormente injetadas por via i.d no dorso de camundongos (18-22 g). Após 2 h, os animais foram submetidos à eutanásia e as peles removidas para análise, a qual consistiu em avaliar se

houve ou não formação do halo hemorrágico no dorso dos camundongos, de acordo com a metodologia descrita a seguir (item 4.2.1).

4.2 ESTUDO DOS EFEITOS TÓXICOS DA METALOPROTEASE

4.2.1 Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica da MP foi determinada segundo a metodologia descrita por OWNBY e COLBERG (1994). Concentrações de veneno bruto (0,1; 0,25; 0,4 e 0,6 µg/g em 50 µL de PBS), da fração BJI (0,1; 0,25; 0,4 e 0,6 µg/g em 50 µL de PBS) e da metaloprotease isolada (1,1; 2,2; 4,5; 9,0 e 11 µg/g em 50 µL de PBS) foram injetadas intradermicamente na região dorsal de camundongos (18-22 g). Após duas horas, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e as peles removidas para avaliação da atividade hemorrágica. A atividade hemorrágica foi avaliada medindo-se os dois diâmetros do halo hemorrágico formado, com auxílio de um escalímetro. Com os valores das médias dos produtos dos diâmetros determinou-se a dose hemorrágica mínima (DHM=µg de enzima que produz um halo hemorrágico de 10 mm).

Avaliou-se também o efeito hemorrágico em função do tempo e do pH. Concentrações equivalentes a 2 x DHM (9µg/g/50 µL de PBS) foram pré-incubadas em diferentes intervalos de tempo (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 h) a 25°C. Cerca de 50 µL de cada solução foi injetada por via i.d. no dorso de camundongos (18-22 g). Após os respectivos tempos, os animais foram sacrificados e as peles removidas para análise, de acordo com o método descrito acima. Para avaliar a influência do pH no efeito hemorrágico, concentrações equivalentes a 2 x DHM (9µg/g) foram incubadas em diferentes condições de pH, por 30 min a 25°C. Cerca de 50 µL de cada solução foram injetadas por via i.d. no dorso de camundongos (18-22g). Após duas horas, os animais foram sacrificados e as peles removidas para análise, de acordo com o

método descrito acima. Os ensaios foram realizados em triplicata e a hemorragia foi avaliada pela visualização do halo hemorrágico. Os valores foram obtidos pela média do produto dos diâmetros dos halos hemorrágicos produzidos na pele dos animais (média $\pm$ SD).

4.2.2 Atividade Edematogênica

Grupos de 05 camundongos (18-22g) foram injetados na região sub plantar da pata direita com 50 μ L de soluções contendo 20 μ g de veneno bruto, 20 μ g da fração BJI e diferentes concentrações de metaloprotease (2,0, 4,0 e 8,0 μ g), dissolvidas em solução salina tamponada em fosfato (PBS). Após 0,5, 1 e 3 h, o edema de pata foi determinado com auxílio de um paquímetro de baixa pressão (Mytutoyo, Japão). Os valores obtidos no tempo zero foram então subtraídos e as diferenças expressas em unidades de edema induzido em milímetros (média $\pm$ SD).

4.2.3 Atividade Miotóxica

Os ensaios de miotoxicidade, utilizando a metaloprotease, foram realizados de acordo com a metodologia descrita por KAPLAN e PESCE (1986), modificada por SOARES et al. (2000). Grupos de 05 camundongos (18-22g) foram injetados no músculo gastrocnêmio direito com 50 μ L de soluções contendo diferentes concentrações de metaloprotease dissolvidas em solução salina tamponada em fosfato (PBS). Após 1, 3, 6 e 24 horas o sangue foi coletado da cauda dos animais com auxílio de tubos capilares heparinizados e posteriormente centrifugados a 4000 x g para a separação do plasma. A atividade de creatina-quinase (CK) foi determinada usando 4 μ L do plasma, posteriormente incubado por 3 min a 37 °C com 0,5 mL do reagente, de acordo com o protocolo cinético CK-UV (Sigma Chemical

Co.) modificado. A atividade foi expressa em U/L, onde uma unidade corresponde à produção de 1 μmol de NADH/minuto.

4.2.4 Atividade Anticoagulante

A atividade anticoagulante foi realizada de acordo com o método descrito por VALENTIN e LAMBEAU (2000) utilizando plasma humano citratado (200 μL), fornecido pelo Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP. Para o ensaio, o plasma foi descongelado e mantido incubado à 37 °C. A metaloprotease, em diferentes concentrações (5,0, 10, 20, 40 e 60 μg) foi então incubada em diferentes intervalos de tempo (5,0, 15, 30, 45 e 60 min) com o plasma e após cada respectivo tempo adicionaram-se 25 μL de CaCl_2 a 0,25 mM. Em seguida, o plasma ficou sob observação periódica, com a finalidade de se verificar a formação do coágulo de fibrina. Se após 45 min o plasma não coagulasse, então foi considerado incoagulável. Com a finalidade de verificar a interação da metaloprotease com íons cálcio, incubou-se a mesma com 25 μL de CaCl_2 a 0,25 mM e em seguida adicionou-se a mistura reacional ao plasma à 37°C. Nos ensaios, como controle utilizou-se somente solução salina tamponada (PBS) no lugar da enzima e em seguida induziu-se a coagulação com 25 μL de CaCl_2 a 0,25 mM, onde a coagulação foi observada e os tempos cronometrados. No teste controle, o plasma coagulou no intervalo de 3 a 6 minutos.

4.3 ESTUDO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DA METALOPROTEASE

4.3.1 Efeito sobre Plaquetas

Os ensaios de agregação plaquetária, utilizando a metaloprotease isolada, foram realizados de acordo com o método previamente descrito por FULY et al. (1997).

Primeiramente obteve-se o plasma rico em plaquetas (PRP), a partir do sangue citratado de coelho (0,31% p/v), o qual foi centrifugado a $360 \times g/12$ min a temperatura ambiente. As amostras de plasma rico em plaquetas foram novamente centrifugadas a $1370 \times g/20$ min e os precipitados obtidos foram suspensos em uma solução de Tyrode livre de cálcio, contendo 0,35 % (p/v) de albumina de soro bovino (BSA) e $1,0 \cdot 10^{-4}$ M de EGTA (concentração final), pH 6,5 e lavados duas vezes por centrifugação. Os precipitados finais foram suspensos em uma solução de Tyrode-BSA, pH 7,5, na ausência de EGTA. A suspensão foi então ajustada para uma concentração de $3,0\text{-}4,0 \times 10^5$ plaquetas/ μL . O ensaio de agregação plaquetária foi avaliado pelo método turbidimétrico, utilizando um agregômetro (Whole Blood Lumi-Aggregometer, Chrono-Log Corporation). A solução contendo plaquetas (200 μL) foi mantida em cuveta siliconizada, sob agitação, a 37°C . Para o teste, diferentes concentrações (5, 15, 30 e 60 μg) da metaloprotease foram adicionadas à solução e incubadas por 2 min, na presença de CaCl_2 ($1,0 \times 10^{-3}$ M). A indução de agregação plaquetária foi realizada com controles positivos (ADP e Colágeno). Como controle positivo de inibição de agregação plaquetária, utilizou-se uma fosfolipase A_2 ácida (BthA-I-PLA₂), isolada de *B. jararacussu* nas mesmas concentrações (5, 15, 30 e 60 μg).

4.3.2 Atividade Bactericida

A atividade bactericida da metaloprotease isolada foi avaliada sobre bactérias *E. coli* e *S. aureus*, de acordo com a metodologia descrita por HEMAN-ACKAH (1975). As linhagens de *E. coli* (ATCC 29648) e *S. aureus* (ATCC 25923) foram submetidas ao crescimento em 10 mL de meio BHI. Para o ensaio, as células de cada linhagem foram ajustadas para 4×10^5 células/mL, utilizando a escala de “Mac Farland”. Alíquotas de cada linhagem celular foram incubadas com diferentes concentrações da MP (40 e 80 μg) por 30 e 60 min à 37°C . Findo esta etapa, a atividade bactericida foi determinada pela metodologia do plaqueamento,

utilizando 50 μ L da solução (linhagem celular + MP) em meio de cultura BHI sólido a 37 °C/12 h. Como controle, utilizaram-se solução contendo linhagem celular e PBS. A porcentagem de inibição foi calculada pela contagem de bactérias sobreviventes.

4.3.3 Ensaio Imunoenzimático

Microplacas (Dynatech) preenchidas com diferentes concentrações da BjuMP-I (40 e 80 μ g/poço) foram incubadas por 16 h em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 9,0 mais NaCl 0,1 M. Após cinco lavagens com a solução A (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M, ZnCl₂ 20 μ M, e MgCl₂ 1 μ M) as placas foram submetidas a secagem e estocadas a 4°C. Os anticorpos purificados (anti-protease de *B. neuwiedi*) foram diluídos na solução A contendo albumina de soro bovina (BSA) a 2% (m/v). Os anticorpos foram adicionados em triplicata às placas, numa diluição de 1:12.500 (m/v) e incubados em temperatura ambiente por 2 horas. As placas foram submetidas novamente a cinco lavagens com a solução A. Em seguida a ligação dos anticorpos foi detectada na presença de anti-imunoglobulina de coelho ou rato conjugado com fosfatase alcalina, diluída 1:2000 (m/v) na solução A contendo BSA e incubada por 90 min. Após uma última lavagem, a coloração foi desenvolvida na presença do substrato p-nitrofenilfosfato e as absorvâncias registradas em microleitor de placas a 410 nm (Dynatech 5000). Os soros normais e a crotamina foram utilizados como controles.

4.4 EFEITO DE INIBIDORES NATURAIS SOBRE METALOPROTEASES

4.4.1 Inibição da Atividade hemorrágica e proteolítica da BjussuMP-I pelo diterpenóide clerodane de *Baccharis trimera* (Asteaceae)

4.4.1.1 Inibição da Atividade Hemorrágica

O extrato metanólico de clerodane (Bt-CD) foi isolado de acordo com a metodologia descrita por JANUÁRIO et al. (2004) e fornecido pelo mesmo autor. A atividade anti-hemorrágica do extrato (Bt-CD) foi determinada após imediata injeção intradérmica da mistura contendo BjussuMP-I (2 DHM):Bt-CD (1:1, 1:5, 1:10 e 1:20, m/m) no dorso de camundongos (18-22g). A hemorragia foi avaliada conforme a metodologia descrita no item 4.2.1. Após duas horas, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e as peles removidas para avaliação da atividade hemorrágica. O efeito inibitório foi avaliado medindo-se os dois diâmetros do halo hemorrágico formado, com auxílio de um escalímetro. Os valores obtidos foram expressos através da média do produto dos diâmetros dos halos hemorrágicos produzidos na pele dos animais (média $\pm$ SD).

4.4.1.2 Inibição da Atividade Proteolítica sobre a Caseína

O extrato metanólico de clerodane (Bt-CD) foi isolado de acordo com a metodologia descrita por JANUÁRIO et al. (2004) e fornecido pelo mesmo autor. Para avaliar o efeito inibitório, 40 μ g da BjussuMP-I foram pré-incubados com BtCD por 30 min a 37 °C. Posteriormente, incubaram-se a mistura contendo BjussuMP-I + BtCD com 1 mL de caseína (1%) em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,6, por 15 min a 37 °C. A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita no item 4.1.4.1. Uma unidade de atividade caseinolítica foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento na absorbância de 0,001 unidades/minuto.

4.4.2 Inibição da Atividade hemorrágica da BjussuMP-I pelo Extrato Aquoso de *Pentaclethra macroloba* (EPema)

O extrato aquoso de *Pentaclethra macroloba* foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Da-SILVA et al. (2005) e fornecido pelo mesmo autor. A atividade anti-hemorrágica do extrato de *Pentaclethra macroloba* foi determinada após imediata injeção intradérmica da mistura contendo BjussuMP-I (2 DHM):Epema (1:1, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:30, m/m) no dorso de camundongos (18-22g). A hemorragia foi avaliada conforme a metodologia descrita no item 4.2.1. Após duas horas, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e as peles removidas para avaliação da atividade hemorrágica. O efeito inibitório foi avaliado medindo-se os dois diâmetros do halo hemorrágico formado, com auxílio de um escalímetro. Os valores obtidos foram expressos através da média do produto dos diâmetros dos halos hemorrágicos produzidos na pele dos animais (média $\pm$ SD).

4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA METALOPROTEASE

4.5.1 Determinação e quantificação dos aminoácidos sob forma de feniltiocarbamil aminoácidos (PTC) (análise de aminoácidos: derivação pré-coluna com fenilisotiocianato)

A composição dos aminoácidos foi determinada em amostras da BjussuMP-I obtidas em CLAE em fase reversa. Amostras referentes aos picos I, obtido da cromatografia de fase reversa (Figura 5) foram previamente hidrolisadas com ácido clorídrico (HCl) bidestilado a 6 N, em fase vapor (BIDLINGMEYER; COHEN e TRAVIS, 1984), seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC), e a separação dos derivativos

feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) em HPLC, utilizando coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag - 3,9 x150 mm) com monitoração em comprimento de onda em 254nm.

Para quantificar os aminoácidos, determinou-se a área de cada pico, tomando-se como referência a área dos picos dos padrões de aminoácidos com concentração conhecida, sendo que o padrão foi derivado nas mesmas condições e ao mesmo tempo que as amostras.

A amostra (BjussuMP-I) neste tipo de análise passou por quatro etapas: A) hidrólise; B) derivação; C) separação e D) quantificação dos PTC aminoácidos.

4.5.2 Hidrólise

Alíquotas, contendo 0,3 a 0,6 mg/mL de proteína, foram pipetadas em tubos de borosilicato (6 x 50mm) pirolisados a 350 °C, e secas em concentrador rotatório Speed-Vac. Estes tubos foram acondicionados em um frasco de reação Pierce (2,5x10cm), com válvula de teflon, sendo possível colocar até 12 tubos de amostras em cada frasco de hidrólise. A hidrólise foi realizada com adição de 200 a 300 µL de HCl 6 a M bidestilado contendo 0,1-0,5% de fenol (p/v), no interior do frasco de hidrólise, tomando-se o cuidado para não colocar o ácido dentro dos tubos que continham as amostras. Este frasco de hidrólise foi fechado, congelado e submetido a vácuo, com fluxo alternado de nitrogênio gasoso (para que todo o oxigênio fosse eliminado do frasco). Após atingir a temperatura ambiente, o frasco foi colocado em uma mufla e mantido a temperatura constante de 110°C ± 0,1 onde permaneceu por 22 horas. Após este período, o excesso de HCl em cada tubo da amostra foi evaporado em concentrador rotatório (Speed-Vac) por 30 min a 50°C. A amostra, contendo a proteína na forma hidrolisada (aminoácidos livres), foi estocada a -20°C até a realização das próximas etapas da análise de aminoácidos.

4.5.3 Derivação

O procedimento de derivação tem como princípio acoplar a proteína hidrolisada (aminoácidos livres) com fenilisotiocianato (PITC), o qual reage quantitativamente com grupamentos amínicos livres do aminoácido, para formar o feniltiocarbamil-derivado (PTC-aminoácido) (Figura 3). Todos os reagentes utilizados nesse procedimento foram de grau seqüencial e/ou cromatográfico.

Cada tubo de amostra foi alcalinizado com 20 µL de uma mistura metanol:água:TEA (trietilamina) na proporção de 2:2:1 (v:v:v), agitado e seco por 15 min à 50°C, em concentrador rotatório (Speed-Vac). O reagente básico utilizado faz com que o grupamento amínico terminal fique na sua forma básica e promova o ataque nucleofílico ao reagente de acoplamento fenilisotiocianato (PITC).

Em seguida adicionaram-se, a cada tubo da amostra, 20µL do reagente de derivação: metanol:água:TEA:PITC na proporção de 7:1:1:1 (v:v:v:v), agitou-se e deixou-se reagir por 20 min a temperatura ambiente. Após este período, o excesso do reagente foi removido em concentrador rotatório Speed-Vac por uma hora a temperatura ambiente (esta etapa é crítica, pois elimina o material que absorve no UV, o qual poderá interferir na detecção dos PTC-aa por absorver em 254nm). Após esta etapa, a amostra derivada e seca permanece estável por até três dias, quando mantida a -20°C.

Todo este procedimento de derivação foi realizado também com a mistura de aminoácidos padrões da Pierce, no qual 20 µL de uma solução 125 nmol/mL foram derivados para a quantificação da amostra.

Figura 3: REACÃO DE ACOPLAMENTO DO AMINOÁCIDO LIVRE AO FENILISOTIOCIANATO (PITC) ORIGINANDO FENILTIOCARBAMIL AMINOÁCIDO (PTC)

4.5.4 Separação dos PTC-aa

A amostra e o padrão, depois de derivados e secos, foram redissolvidos em tampão de amostra: acetato de sódio (NaAc) 0,14 M com 0,06% de TEA (v/v), pH 7,5, contendo 5% de acetonitrila (AcN) (v/v). A separação dos PTC-aa do pico referente à metaloprotease e do padrão foram ressuspensos em 500 μL de tampão de amostra e 20 μL (4% da amostra total hidrolisada) foram injetados na coluna. O padrão de aminoácidos possui 100 Picomols de cada aminoácido em 20 μL aplicados. Para aumentar a sensibilidade do método, o volume final da amostra pode variar até 50 μL , permitindo deste modo a injeção de até 40% da amostra hidrolisada na coluna.

Os solventes utilizados na separação dos aminoácidos foram: solvente A- acetato de sódio (NaAc) 0,14 M com 0,06% de TEA, pH 5,7 (filtrado em membrana 0,45 μm) e solvente B- Acetonitrila (AcN) e água na proporção de 60:40 (v/v). Os aminoácidos foram separados segundo o protocolo de separação desenvolvido por BIDLINGMEYER, COHEN e TARVIN (1984). Utilizou-se para este tipo de separação uma coluna C18 Pico-Tag Waters com dimensões de 3,9 x 150mm. A cromatografia foi desenvolvida a temperatura constante de

$38,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, em equipamento CM4000 da (Milton Roy Co.), com sistema de bombas binárias; espectrofotômetro com comprimento de onda fixo em 254 nm e célula de fluxo contínuo de 10 μL . Os dados foram coletados em um computador com o programa “Thermo Chrom III da Thermo Separation Products”. Um gradiente crescente de acetonitrila foi utilizado para esta separação (ATHERTON, 1989), com um fluxo de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A existência de um tempo de equilíbrio de 10 min em 5% de solvente B logo após a limpeza da coluna com 100% do solvente B é crítico para haver reprodutibilidade dos tempos de eluição dos PTC-aa.

4.5.5 Quantificação dos PTC-aa

Para obter uma análise de aminoácidos precisa e confiável, realizaram-se duplicatas de hidrólise (quando possível) ou de injeção da mesma hidrólise, e observou-se para que o coeficiente de variação entre elas fosse $\leq 10\%$ (critério de confiança do método). Uma curva dose-resposta do padrão foi construída para demonstrar a existência de uma relação linear entre a área do pico e a quantidade de aminoácidos derivados, e esta se encontrou em uma faixa entre 25 e 2500 pmol de cada aminoácido aplicado na coluna (dados não demonstrados).

4.5.6 Quantificação da Metaloprotease

A análise de aminoácidos é utilizada para quantificar proteína, calculando-se a massa total através do picomol (pmol) do aminoácido multiplicado pela massa molecular “desidratada” dos aminoácidos, e ao final somando-se todos os aminoácidos.

4.6 Sequenciamento Automático da Metaloprotease

O sequenciamento da metaloprotease foi realizado num microsequenciador automático de proteína Procise modelo 491 (Applied Biosystem) o qual utiliza o processo químico de sequenciamento por clivagem N-terminal, derivado do método desenvolvido por Pehr Edman (EDMAN, 1950). Este processo teve como princípio a reativação específica do terminal amínico da proteína ou peptídeo, com conversão ao PITC e a remoção seletiva deste terminal amínico por uma ciclização intramolecular, enquanto que o restante da molécula permanece intacto. Cada ciclo da degradação remove sequencialmente um aminoácido do terminal amínico do polipeptídeo. Este processo cíclico, que fornece parte da estrutura primária, pode ser subdividido em quatro etapas: 1- acoplamento; 2- clivagem; 3-conversão e 4-identificação e quantificação, as quais são realizadas a cada ciclo. O sequenciamento automático da BjussuMP-I foi realizado em colaboração com o Laboratório de Química de Proteínas da FCFRP-USP, sob supervisão do Prof. Dr. Lewis Joel Greene.

4.7 Clonagem e Sequenciamento do cDNA

O RNA total foi extraído a partir da glândula do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* usando o método do TrizolTM conforme especificações do fabricante. Posteriormente, 5 µg do RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita do cDNA da toxina na presença de transcriptase reversa e oligo dT durante 1 hora a 42°C. A segunda fita foi sintetizada utilizando-se 2 µL da reação descrita acima, combinados com os *primers* gerais e específicos para a enzima amplificar o(s) gene(s) de interesse. Os *primers* usados foram desenhados de acordo com: (i) as seqüências N-

terminal e C-terminal de outras MPs de veneno de serpentes da classe P-III e (ii) sequência de aminoácidos internos da BjussuMP-I.

O produto foi analisado quanto ao tamanho amplificado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. A seguir, foi realizada a purificação do produto de PCR utilizando-se o kit *Concert Rapid PCR Purification System* (Gibco BRL), conforme as especificações do fabricante. A reação de sequenciamento foi conduzida a partir do produto purificado usando o kit *ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (Perkin Elmer) e a eletroforese no aparelho *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer), usando gel de poliacrilamida a 4%, uréia 6 M. A eletroforese foi conduzida a 1500V, temperatura de 51°C, durante 7 horas. Os eletroferogramas obtidos foram analisados através do programa *ABI Analysis Data Collection* e as seqüências foram posteriormente analisadas através do *software Sequencher* versão 3.1. A seqüência obtida foi analisada quanto à homologia com nucleotídeos e aminoácidos com as seqüências de outras toxinas previamente depositadas no GenBank e SwissProt. Adicionalmente foi realizado o alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir do Clustal W.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento e Caracterização Bioquímica da Metaloprotease

A purificação do fator hemorrágico do veneno de *B. jararacussu*, denominado neste trabalho BjussuMP-I, foi efetuada em 2 etapas: filtração em coluna contendo gel de Sephacryl S-200 e cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose CL-4B.

Na Figura 4 verifica-se que o fracionamento do veneno bruto em Sephacryl S-200 resultou em 4 picos, denominados de BJI a BJIV.

O efeito hemorrágico foi identificado no pico BJI e com menor intensidade no pico BJII.

O pico BJI, selecionado para prosseguir com as etapas de purificação e ensaios biológicos e/ou enzimáticos representa 16% (56 mg), em relação ao veneno bruto (Tabela I). Observando-se o perfil eletroforético, em SDS-PAGE (Fig. 10) verifica-se que alguns componentes de massa molecular baixa foram removidos nesta etapa.

Na Figura 5 verifica-se sete picos após a cromatografia do pico BJI em Phenyl Sepharose CL-4B, denominados em nosso trabalho de BJI-SI a BJI-SVII.

Dos sete picos cromatografados, três apresentaram atividade hemorrágica em diferentes intensidades (BJI-SIV, BJI-SV e BJI-SVI). A fração BJI-SVI foi selecionada para a caracterização bioquímica, funcional e estrutural, e passou a ser denominada de BjussuMP-I.

A Tabela I, mostra o rendimento de purificação da fração BjussuMP-I, onde a mesma representou, aproximadamente 0,6% do veneno bruto. Na Figura 6 verifica-se a presença de um único pico na CLAE da BjussuMP-I. Nas Figuras 7 e 8 observa-se que a massa molecular desta metaloprotease é de 60.000 Da.

Figura 4. CROMATOGRAPHIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR DO VENENO BRUTO DE *B. jararacussu* EM COLUNA (120 x 2,2 cm) CONTENDO GEL DE SEPHACRYL S-200. 300 mg do veneno bruto foram dissolvidos em 3 mL de tampão Tris-HCl (0,01 M, pH 7,0) mais CaCl₂ (0,02 M) e aplicado na coluna previamente equilibrada e eluída com o mesmo tampão. Foram coletadas frações de 3 mL/tubo a um fluxo de 10 mL/h a temperatura ambiente. (*) Fração com alta atividade hemorrágica: BJIII; (*) Fração de menor atividade hemorrágica.

Figura 5: CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA DA FRAÇÃO BJI EM COLUNA (5,9 x 1,5 cm) CONTENDO PHENYL-SEPHAROSE CL-4B. 50 mg da fração BJI foram dissolvidas em 2 mL de tampão Tris-HCl (0,01 M pH 7,6 mais NaCl 4 M) e aplicados na coluna equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi eluída em gradiente gradativo, decrescente com tampão Tris-HCl (0,01 M pH 7,6 mais NaCl (4-0 M). Foram coletadas frações de 2,5 mL/tubo a um fluxo de 50 mL/h e avaliadas quanto à absorbância a 280 nm e atividade caseinolítica.

Tabela I: Rendimento da purificação da metaloprotease do veneno de *B. jararacussu*

Etapas de purificação	Proteína total (mg)	*Atividade enzimática Total (U _T)	**Atividade enzimática específica (U/mg)	Recuperação (% massa)	Recuperação da atividade (%)	Atividade relativa
VB	350	430	1,2	100	100	1
Sephacryl S-200 (BJI)	56	420	7,5	16	97,6	6,25
Phenyl-Sepharose (BjussuMP-I)	2	40	20	0,57	9,3	16,6

VB: Veneno bruto de *B. jararacussu*

UT: Unidades de atividade total

* A atividade enzimática foi determinada utilizando caseína (1%) como substrato. Uma unidade de atividade caseinolítica foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento na absorbância de 0,001 unidades/minuto.

* A atividade enzimática específica (U/mg) foi calculada através da relação entre a atividade enzimática total pela concentração protéica total (A_{310}).

Figura 6: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM COLUNA DE FASE REVERSA DA FRAÇÃO BjussuMP-I. Coluna Shimadzu SPD C-18 (4,6 x 25 mm). 1mg da amostra foi dissolvida em 200 μ L de solvente A (TFA 0,1%) e eluída com gradiente linear de 40% do solvente B-(Acetonitrila:TFA, 80%:0,09%) a um fluxo de 1mL/min, durante 50 minutos. A absorbância foi monitorada a 280 nm.

Figura 7: ANÁLISE EM SDS-PAGE DO VENENO DE *B. JARARACUSSU* E DAS FRAÇÕES COM ATIVIDADE HEMORRÁGICA. Eletroforese realizada em condições redutoras em gel de poliacrilamida (acrilamida 12%), tampão Tris-glicina 0,01 M, pH 8,3 e SDS 0,1% por 120 min. a 10 mA e 100 V. O gel foi corado com Coomassie blue R-250 0,2% (p/v) em água:metanol (1:1, v/v) por 10 min e descorado com ácido acético 10% (v/v).

- 1- Veneno bruto de *B. jararacussu* (4,0 µg/µL);
- 2- BJI (2 µg/µL);
- 3- Bjussu MP-I (Figura 8: 4,0 µg/µL)
- 4- Padrão de massa molecular: fosforilase b (94.000 Da), soro albumina bovina (67.000 Da), ovoalbumina (43.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina de soja (20.100 Da) e α -lactalbumina (14.400 Da).

Figura 8: DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA BjussuMP-I POR SDS-PAGE. Eletroforese realizada em condições redutoras em gel de poliacrilamida (acrilamida 12%), tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3 e SDS 0,1% por 120 min. a 10 mA e 100 V. Valores foram expressos em logaritmo da massa molecular de cada marcador contra as mobilidades eletroforéticas relativas (Rf) dos padrões de massa molecular e da metaloprotease. Padrões: fosforilase b (94.000 Da), soro albumina bovina (67.000 Da), ovoalbumina (43.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina de soja (20.100 Da) e α -lactalbumina (14.400 Da).

5.2 Caracterização Funcional da Metaloprotease: Efeitos Toxicológicos e Farmacológicos

5.2.1 Avaliação da atividade hemorrágica

A Figura 9 mostra a dose hemorrágica mínima (DHM) do veneno bruto de *B. jararacussu* (0,56 µg). Na Figura 10 observa-se que a dose hemorrágica mínima da fração BJI obtida da cromatografia em Sephacryl S-200 é 0,27 µg. Na Figura 11 podemos observar que fração BjussuMP-I induziu hemorragia com uma dose hemorrágica mínima (DHM) de 4,5 µg, ou seja, uma DHM 8,03 vezes maior em relação ao veneno bruto e 16,6 vezes maior que a fração BJI.

A Figura 12A mostra os halos hemorrágicos produzidos por concentrações crescentes da BjussuMP-I quando da determinação da DHM. A Figura 12B mostra a ação do EDTA na neutralização da hemorragia induzida pela BjussuMP-I (4,5 µg).

As Figuras 13 e 14 demonstram a influência do pH e do tempo, respectivamente, sobre a hemorragia induzida pela fração BjussuMP-I. Na figura 13 observa-se que o tempo não exerce influência na atividade hemorrágica, onde 30 min foram suficientes para a BjussuMP-I induzir a hemorragia. Verifica-se na Figura 14 que não ocorreu nenhuma alteração do efeito hemorrágico quando incubou-se a enzima em diferentes pHs.

Figura 9: DETERMINAÇÃO DA DOSE HEMORRÁGICA MÍNIMA (DHM) DO VENENO BRUTO DE *B. jararacussu*. Diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,4 e 0,6 µg em 50 µl de PBS) do veneno bruto foram injetados, via i.d. no dorso de camundongos (18-22 g). A hemorragia foi quantificada através da média dos diâmetros dos halos hemorrágicos. A DHM é a concentração de toxina que induz uma área hemorrágica de 10 mm de diâmetro (DHM=0,56 µg de veneno bruto). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5)

Figura 10: DETERMINAÇÃO DA DOSE HEMORRÁGICA MÍNIMA (DHM) DA FRAÇÃO BJI. Diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,4 e 0,6 µg/g em 50 µl de PBS) de BJI foram injetados, via i.d., no dorso de camundongos (18-22 g). A hemorragia foi quantificada através da média dos diâmetros dos halos hemorrágicos. A DHM é a concentração de toxina que induz uma área hemorrágica de 10 mm de diâmetro (DHM=0,27 µg de BJI). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5)

Figura 11: DETERMINAÇÃO DA DOSE HEMORRÁGICA MÍNIMA (DHM) DA METALOPROTEASE (FRAÇÃO BjussuMP-I). Diferentes concentrações (1,1; 2,2; 4,5; 9,0 e 11 µg em 50 µL de PBS) da enzima foram injetados, via i.d., no dorso de camundongos (18-22 g). A hemorragia foi quantificada através da média dos diâmetros dos halos hemorrágicos. A DHM é a concentração de toxina que induz uma área hemorrágica de 10 mm de diâmetro (DHM=4,5 µg de Bujussu MP-I). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

Figura 12: AVALIAÇÃO DA HEMORRAGIA NAS PELES DE CAMUNDONGOS. (A)- Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM=4,5) da metaloprotease (BjssuMP-I) em camundongos (item 4.2.1). (B)-Neutralização do efeito hemorrágico produzido pelo EDTA. 4,5 µg da toxina foram incubados com EDTA 1mM/15 min e injetados via i.d no dorso de camundongos (18-22 g). Após 2 h, os animais foram submetidos à eutanásia e as peles removidas para análise.

Figura 13: INFLUÊNCIA DO TEMPO NA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA METALOPROTEASE (BjussuMP-I). Concentrações equivalentes a duas DHM (9 µg em 50 µL de PBS) foram injetadas por via id., no dorso de camundongos (18-22 g). Os camundongos foram submetidos à eutanásia em diferentes intervalos de tempo (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 h) e a hemorragia foi avaliada (item 4.2.1) pela visualização do halo hemorrágico. Os ensaios foram realizados em triplicata e a hemorragia foi avaliada através da visualização do halo hemorrágico.

- 1-BjussuMP-I (9µg) após 0,5 hora
- 2-BjussuMP-I (9µg) após 1,0 hora
- 3-BjussuMP-I (9µg) após 2,0 horas
- 4-BjussuMP-I (9µg) após 3,0 horas
- 5-BjussuMP-I (9µg) após 4,0 horas
- 6- Controle: PBS (50 µL)

Figura 14: EFEITO DO pH NA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA METALOPROTEASE (BjussuMP-I). Concentrações equivalentes a duas DHM (9 μ g) foram incubadas em diferentes condições de pH, por 30 minutos a 25°C. 50 μ L de cada solução foram injetados por via id., no dorso de camundongos (18-22g). Após duas horas, os animais foram submetidos à eutanásia e as peles removidas para análise (item 4.2.1). Os ensaios foram realizados em triplicata e a hemorragia foi avaliada através da visualização do halo hemorrágico.

- 1- BjussuMP-I (9 μ g): pH 2,5
- 2- BjussuMP-I (9 μ g): pH 3,5
- 3- BjussuMP-I (9 μ g): pH 4,5
- 4- BjussuMP-I (9 μ g): pH 5,5
- 5- BjussuMP-I (9 μ g): pH 7,0
- 6- BjussuMP-I (9 μ g): pH 8,0
- 7- Controle: PBS (50 μ l)

5.2.2 Avaliação das atividades edematogênica e miotóxica

Os resultados da Figura 15 mostram que a metaloprotease isolada não foi capaz de induzir edema quando concentrações de 2,0 a 8,0 µg dessa fração foram injetadas via intradérmica na pata de camundongos. No mesmo ensaio, verificamos que o edema induzido pelo veneno bruto foi maior do que o observado com a fração BJI e ambos resultados não foram dependentes do tempo, uma vez que após meia hora o efeito foi evidenciado.

A Figura 16 permite verificar que a fração BjussuMP-I (30 µg), comparativamente a uma fosfolipase, BthTX-I, isolada do mesmo veneno, não induziu a miotoxidade no músculo gastrocnemius do camundongo, mesmo quando avaliados por longos períodos.

5.2.3 Efeito proteolítico da metaloprotease sobre diferentes substratos: gelatina e colágeno

O resultado apresentado na Figura 17 mostra que o veneno bruto e fração BJI degradaram a gelatina, porém o mesmo efeito não foi observado com a fração BjussuMP-I, mesmo com 100 µg da enzima.

Na Figura 18 verifica-se que a fração BjussuMP-I degradou especificamente a cadeia γ do colágeno tipo IV de placenta humana com concentrações acima de 16 µg.

Figura 15: ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA INDUZIDA PELO VENENO BRUTO DE *B. jararacussu*, FRAÇÃO BJI E METALOPROTEASE (BjussuMP-I). Diferentes concentrações do veneno bruto e frações foram injetadas na região plantar da pata direita de camundongos (18-22 g). O aumento da área na pata foi avaliado após 0,5, 1 e 3 horas com um paquímetro (Mytutoyo, Japão) e os resultados expressos em unidades de edema induzido em milímetros. PBS foi utilizado como controle negativo e o veneno bruto como controle positivo. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

Figura 16: ATIVIDADE MIOTÓXICA INDUZIDA PELA METALOPROTEASE

(BjussuMP-I). 30 μ g da fração BjussuMP-I em 50 μ L de PBS foram injetados por via i.m no músculo gastrocnêmio de camundongos (18-22 g). Como controles foram utilizados PBS (50 μ L) e Fosfolipase A₂ (BthTX-I=30 μ g) isolada do veneno de *B. jararacussu*. O sangue foi coletado em diferentes intervalos de tempo e os níveis de creatina cinase (CK) foram determinados de acordo com o protocolo cinético CK-UV (item 4.2.3, material e métodos). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

Figura 17: ANÁLISE EM SDS-PAGE DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DA METALOPROTEASE (BjussuMP-I). Eletroforese em condições não-redutoras em gel de poliacrilamida (acrilamida 12% co-polimerizada com gelatina 0,3%), tampão Tris-Glicina 0,1 M, pH 8,3, SDS (0,1%) por 120 min. a 10 mA constante e voltagem variando entre 70 e 100 V. O gel foi corado com Azul de comassie R-250 0,2% (p/v) em água:metanol (1:1, v/v) por 10 min e descorado com ácido acético 10% (v/v). As bandas claras indicam atividade gelatinolítica.

1- Veneno bruto (50 µg)

2- Veneno bruto (100 µg)

3- BJI (50 µg)

4- BJI (100 µg)

5- BjussuMP-I (50 µg)

6- BjussuMP-I (100 µg)

7- Padrão de massa molecular: fosforilase b (94.000 Da), soro albumina bovina (67.000 Da), ovoalbumina (43.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina de soja (20.100 Da).

Figura 18: ANÁLISE EM SDS-PAGE DO EFEITO DA METALOPROTEASE (FRAÇÃO BjussuMP-I) SOBRE O COLÁGENO. Eletroforese em condições redutoras em gel de poliacrilamida (acrilamida 12%), tampão Tris-Glicina 0,1 M, pH 8,3, SDS (0,1%) por 2 hs. a 10 mA constante e voltagem variando entre 70 e 100 V. O gel foi corado com prata, de acordo com protocolo (Pharmacia). Amostras de 15 μ L do colágeno tipo IV de placenta humana (3 μ g/ μ L) foram incubados com diferentes concentrações da metaloprotease/BjussuMP-I a 37 °C por 2 horas, pH 7,5.

- 1- Controle: colágeno a 3 μ g/ μ L
- 2- colágeno + BjussuMP-I-2,0 μ g
- 3- colágeno + BjussuMP-I-4,0 μ g
- 4- colágeno + BjussuMP-I-8,0 μ g
- 5- colágeno + BjussuMP-I-16,0 μ g
- 6- colágeno + BjussuMP-I-32 μ g
- 7- colágeno + BjussuMP-I-64 μ g
- 8- colágeno + BjussuMP-I-100 μ g

5.2.4 Efeito da metaloprotease sobre os componentes da coagulação (fibrinogênio, fibrina e plaquetas)

5.2.4.1 Avaliação da atividade anticoagulante

Os resultados apresentados na Figura 19 mostram que a fração BjussuMP-I não apresentou atividade coagulante direta, mas demonstrou efeito pró-coagulante indireto, onde se observou uma diminuição no tempo de coagulação do plasma em aproximadamente 50%, após a adição de CaCl_2 como agente coagulante.

5.2.4.2 Avaliação da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio e fibrina

A Figura 20, mostra que 0,5 μg da BjussuMP-I foram suficientes para degradar a cadeia α do fibrinogênio, a qual foi totalmente hidrolisada com 1,0 μg da enzima. Na mesma figura, observa-se que a cadeia β foi hidrolisada com 16 e 32 μg da enzima e a cadeia γ permaneceu inalterada.

Na Figura 21, os resultados mostram claramente que 15 min de incubação com o fibrinogênio foram suficientes para visualizar a degradação total da cadeia α do fibrinogênio. Nessa mesma figura observa-se que após 12 horas de incubação, a cadeia β foi totalmente degradada e a cadeia γ permaneceu inalterada.

Com relação ao pH, a atividade da metaloprotease sobre a cadeia α do fibrinogênio foi mais eficiente nos pHs de neutro à alcalino (Figura 22).

Na Figura 23, a avaliação da atividade fibrinogenolítica em função da temperatura mostra que a metaloprotease é uma enzima termolábil, tornando-se inativa a 4°C e em temperaturas elevadas (75 e 100°C). No entanto a 37°C a enzima demonstrou efetividade catalítica, hidrolisando a cadeia α do fibrinogênio.

Na avaliação do efeito de metais sobre a atividade fibrinogenolítica verifica-se que a BjussuMP-I hidrolisou a cadeia α do fibrinogênio, na presença de íons Ca^{++} e Mg^{++} . Na presença de Mn^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Co^{++} e Ni^{++} , observou-se inibição da atividade enzimática (Figura 24).

Na Figura 25 verifica-se o efeito de inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica da fração BjussuMP-I. Observa-se que a enzima foi completamente inibida na presença de agentes quelantes de metais (EDTA e EGTA), aprotinina, e 1,10-fenantrolina, não se observando a degradação total da cadeia α do fibrinogênio.

Na Figura 26, comparativamente aos controles positivos (veneno bruto e fração BJI), observa-se que concentrações crescentes da BjussuMP-I degradaram o coágulo de fibrina, após 12 horas de incubação à 37°C.

5.2.4.3 Avaliação do efeito da metaloprotease sobre plaquetas

A Figura 27 demonstra que baixas concentrações da enzima BjussuMP-I (5 μg) apresentaram propriedades inibitórias sobre a agregação de plaquetas, na presença de ADP e colágeno, principais indutores de agregação plaquetária. Utilizando-se concentrações mais altas da enzima (60 μg) observa-se uma inibição máxima de 90 %. Em relação à fosfolipase A_2 (BthA-I- PLA_2), potente inibidor de agregação plaquetária e isolada do mesmo veneno, o efeito inibitório observado foi semelhante.

Figura 19: ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA METALOPROTEASE EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO. 50 µg da metaloprotease foram incubados em diferentes condições de ensaio com plasma humano citratado: A-Control positivo; B-metaloprotease + plasma; C-Metaloprotease + CaCl₂ + plasma. A coagulação foi observada e os tempos demarcados. Os resultados foram expressos pela média ± SD (n=5)

Figura 20: ANÁLISE DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA METALOPROTEASE (BjussuMP-I) NA ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA. Eletroforese em condições redutoras em gel de poliacrilamida (acrilamida 12%), tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3, SDS (0,1%) por 2 h. a 10 mA constante e voltagem variando entre 70 e 100 V. O gel foi corado com Azul de Comassie R-250 0,2% (p/v) em água:metanol (1:1, v/v) por 10 min e descorado com ácido acético 10% (v/v). Amostras de 10 μ L do fibrinogênio (2 μ g/ μ L) foram incubados com diferentes concentrações da metaloprotease/BjussuMP-I a 37°C por 2 h. pH 7,5.

- 1- Controle: fibrinogênio (2 μ g/ μ L)
- 2- fibrinogênio + BjussuMP-I-0,5 μ g
- 3- fibrinogênio + BjussuMP-I-1,0 μ g
- 4- fibrinogênio + BjussuMP-I-2,0 μ g
- 5- fibrinogênio + BjussuMP-I-4,0 μ g
- 6- fibrinogênio + BjussuMP-I-8,0 μ g
- 7- fibrinogênio + BjussuMP-I-16 μ g
- 8- fibrinogênio + BjussuMP-I-32 μ g

Figura 21: ANÁLISE DO EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DA METALOPROTEASE (BjussuMP-I) NA ATVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA. Eletroforese em condições redutoras em gel de poliacrilamida (acrilamida 12%), tampão Tris-Glicina, pH 8,3, SDS (0,1%) por 2 h. a 10 mA constante e voltagem variando entre 70 e 100 V. O gel foi corado com Azul de Comassie R-250 0,2% (p/v) em água:metanol (1:1, v/v) por 10 min e descorado com ácido acético 10% (v/v). Para o ensaio, 10 μ L do fibrinogênio (2 μ g/ μ L) foram incubados com a metaloprotease/BjussuMP-I (4 μ g) a diferentes intervalos de tempo a 37°C, pH 7,5.

- 1- Controle: fibrinogênio a 2 μ g/ μ L
- 2- fibrinogênio (2 μ g/ μ L) + BjussuMP-I: 15 minutos
- 3- fibrinogênio (2 μ g/ μ L) + BjussuMP-I: 30 minutos
- 4- fibrinogênio (2 μ g/ μ L) + BjussuMP-I: 1 hora
- 5- fibrinogênio (2 μ g/ μ L) + BjussuMP-I: 2 horas
- 6- fibrinogênio (2 μ g/ μ L) + BjussuMP-I: 6 horas
- 7- fibrinogênio (2 μ g/ μ L) + BjussuMP-I: 12 horas
- 8- fibrinogênio (2 μ g/ μ L) + BjussuMP-I: 24 horas

Figura 22: ANÁLISE DO EFEITO DO pH NA ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA DA METALOPROTEASE (BjussuMP-I). Eletroforese em condições redutoras em gel de poliacrilamida (acrilamida 12%), tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3, SDS (0,1%) por 2 h. a 10 mA constante e voltagem variando entre 70 e 100 V. O gel foi corado com Azul de Coomassie R-250 0,2% (p/v) em água:metanol (1:1, v/v) por 10 min e descorado com ácido acético 10% (v/v). Para o ensaio, 10 μ L do fibrinogênio (2 μ g/ μ L) foram incubados com a metaloprotease/BjussuMP-I (4 μ g) por 15 min a 37°C em diferentes pHs.

- 1- Controle: fibrinogênio (2 μ g/ μ L)
- 2- fibrinogênio + BjussuMP-I: pH 2,5
- 3- fibrinogênio + BjussuMP-I: pH 3,5
- 4- fibrinogênio + BjussuMP-I: pH 4,5
- 5- fibrinogênio + BjussuMP-I: pH 5,5
- 6- fibrinogênio + BjussuMP-I: pH 7,0
- 7- fibrinogênio + BjussuMP-I: pH 8,0

F

igura 23: ANÁLISE DO EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA DA METALOPROTEASE (BjussuMP-I). Eletroforese em condições redutoras em gel de poliacrilamida (acrilamida 12%), tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3, SDS (0,1%) por 2 h. a 10 mA constante e voltagem variando entre 70 e 100 V. O gel foi corado com Azul de Comassie R-250 0,2% (p/v) em água:metanol (1:1, v/v) por 10 min e descorado com ácido acético 10% (v/v). Para o ensaio, 10 μ L do fibrinogênio (2 μ g/ μ L) foram incubados com a metaloprotease/BjussuMP-I (4 μ g) por 15 min. em diferentes temperaturas de incubação.

- 1- Controle: fibrinogênio a 2 μ g/ μ L
- 2- fibrinogênio + BjussuMP-I: 4°C
- 3- fibrinogênio + BjussuMP-I: 37°C
- 4- fibrinogênio + BjussuMP-I: 50°C
- 5- fibrinogênio + BjussuMP-I: 75°C
- 6- fibrinogênio + BjussuMP-I: 100°C

Figura 24: ANÁLISE DO EFEITO DE ÍONS DIVALENTES NA ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA DA METALOPROTEASE (BjussuMP-I). Eletroforese em condições redutoras em gel de poliacrilamida (acrilamida 12%), tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3, SDS (0,1%) por 2 h. a 10 mA constante e voltagem variando entre 70 e 100 V. O gel foi corado com Azul de Comassie R-250 0,2% (p/v) em água:metanol (1:1, v/v) por 10 min e descorado com ácido acético 10% (v/v). Para o ensaio, 10 μ L do fibrinogênio (2 μ g/ μ L) foram incubados com a metaloprotease/BjussuMP-I (4 μ g) por 15 min. a 37°C, na presença de diferentes íons, na concentração de 40 mM.

- 1- Controle: fibrinogênio (2 μ g/ μ L)
- 2- Controle: BjussuMP-I + fibrinogênio
- 3- BjussuMP-I + Ca^{++} + fibrinogênio
- 4- BjussuMP-I + Mg^{++} + fibrinogênio
- 5- BjussuMP-I + Mn^{++} + fibrinogênio
- 6- BjussuMP-I + Fe^{++} + fibrinogênio
- 7- BjussuMP-I + Zn^{++} + fibrinogênio
- 8- BjussuMP-I + Co^{++} + fibrinogênio
- 9- BjussuMP-I + Ni^{++} + fibrinogênio

Figura 25: ANÁLISE DO EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA DA METALOPROTEASE (BjussuMP-I). Eletroforese em condições redutoras em gel de poliacrilamida (acrilamida 12%), tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3, SDS (0,1%) por 2 h. a 10 mA constante e voltagem variando entre 70 e 100 V. O gel foi corado com Azul de Comassie R-250 0,2% (p/v) em água:metanol (1:1, v/v) por 10 min e descorado com ácido acético 10% (v/v). Para o ensaio, 10 μ L do fibrinogênio (2 μ g/ μ L) foram incubados com a metaloprotease/BjussuMP-I (4 μ g) por 15 min. a 37°C, na presença de diferentes inibidores, na concentração de 20 mM.

- 1- Controle: fibrinogênio (2 μ g/ μ L)
- 2- Controle: BjussuMP-I + fibrinogênio (2 μ g/ μ L)
- 3- BjussuMP-I + EDTA + fibrinogênio
- 4- BjussuMP-I + EGTA + fibrinogênio
- 5- BjussuMP-I + PMSF + fibrinogênio
- 6- BjussuMP-I + aprotinina + fibrinogênio
- 7- BjussuMP-I + leupeptina + fibrinogênio
- 8- BjussuMP-I + β -mercaptoetanol + fibrinogênio
- 9- BjussuMP-I + 1,10-fenantrolina + fibrinogênio

Figura 26: ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA DO VENENO BRUTO, FRAÇÃO BJ-I E METALOPROTEASE (BjussuMP-I) SOBRE O COÁGULO DE FIBRINA. Placas de petri (85 x 15 mm) contendo fibrinogênio 0,3%:agarose 0,95% (1:1, v/v) dissolvidos em tampão Barbital 50 mM, pH 7,8 (CaCl₂ 0,0016 M, MgCl₂ 0,00068 M e NaCl 0,09396 M). A mistura fibrinogênio-agarose foi coagulada com 100 µL de trombina (1µg/µL). Após 30 min a 4°C alíquotas de 30 µL do veneno bruto, fração BJ-I e BjussuMP-I (em diferentes concentrações) foram adicionadas. As placas foram incubadas a 37°C/12 horas e as lises determinadas pela média dos diâmetros. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

- 1- Controle: Veneno bruto-15 µg
- 2- Controle: Fração BJ-I-15 µg
- 3- BjussuMP-I -3 µg
- 4- BjussuMP-I-6 µg
- 5- BjussuMP-I-15 µg
- 6- BjussuMP-I-30 µg
- 7- BjussuMP-I-60 µg
- 8- BjussuMP-I-120 µg

Figura 27: EFEITO DA METALOPROTEASE (BjuissuMP-I) NA AGREGAÇÃO DE PLAQUETAS INDUZIDA POR COLÁGENO E ADP. Para o ensaio, diferentes concentrações (5,0 15, 30 e 60 µg) da metaloprotease ou fosfolipase A₂ ácida (BthA-I-PLA₂) foram adicionadas à solução contendo plasma rico em plaquetas (PRP) e incubadas por 2 min, na presença de Ca⁺⁺ (1,0 x 10⁻³ M). Para o ensaio foram utilizados como controles positivos ADP e Colágeno. O ensaio foi realizado pelo método turbidimétrico (item 4.3.1). Os resultados foram expressos pela média ± SD (n=3)

5.2.5 Avaliação do efeito bactericida da Metaloprotease

Na Figura 28 verifica-se que 40 e 80 µg da enzima BjussuMP-I, inibiram o crescimento de ambos microrganismos, *E. coli* e *S. aureus*. Com 40 µg da enzima, em 30 min observa-se uma inibição entre 50 e 30% das UFC de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, e em 60 min verifica-se uma inibição entre 70 e 60%. Com 80 µg da enzima verifica-se uma inibição maior das UFC de aproximadamente 80%.

5.3 Efeito de Inibidores Naturais sobre Metaloproteases

5.3.1 Inibição da atividade hemorrágica e proteolítica da BjussuMP-I pelo diterpenóide Clerodane de *Baccharis trimera* (Asteaceae)

Os efeitos hemorrágico e proteolítico sobre a caseína de ambos, veneno bruto e BjussuMP-I foram significativamente neutralizados com doses crescentes do diterpenóide isolado (Bt-CD). Na Figura 29 observa-se uma inibição de 80% do efeito hemorrágico induzido pela BjussuMP-I.

Na Figura 30 verifica-se uma inibição de 80% da atividade caseinolítica induzida pela BjussuMP-I, e uma inibição de 89% do efeito proteolítico da Neuwiedase, uma metaloprotease não hemorrágica da classe P-I.

5.3.2 Inibição da Atividade Hemorrágica da BjussuMP-I pelo Extrato Aquoso de *Pentaclethra macroloba* (EPema)

A Figura 31 mostra que o extrato aquoso da EPema neutralizou totalmente o efeito hemorrágico induzido pelo veneno bruto de *B. jararacussu* e a BjussuMP-I, numa razão de 1:20 (veneno bruto/BjussuMP-I:EPema, m/m).

Figura 28: ATIVIDADE BACTERICIDA DA BjussuMP-I SOBRE *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Diferentes concentrações da enzima (40 e 80 µg) foram incubadas com $4,0 \times 10^5$ CFU por 30 e 60 min (item 4.3.2). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3)

Figura 29: INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA BjussuMP-I PELO DITERPENÓIDE CLERODANE DE *Bacharis trimera* (Bt-CD). A atividade anti-hemorragica foi determinada após injeção via i.d. no dorso de camundongos (18-22 g) da mistura Bjussu-VB (veneno bruto de *B. jararacussu*)/Bneu-VB (veneno bruto de *B. neuwiedi* e BjussuMP-I:Bt-CD (1:1, 1:5, 1:10 e 1:20, m/m). A hemorragia foi avaliada conforme a metodologia descrita no item 4.2.1. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

Figura 30: INIBIÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA BjussuMP-I PELO DITERPENÓIDE CLERODANE DE *Bacharis trimera* (Bt-CD). A inibição da atividade proteolítica sobre a caseína (1%) foi determinada após pré-incubação de 40 μ g de: Bjussu (veneno bruto de *B. jararacussu*); Bneu (veneno bruto de *B. neuwiedi*); neuwiedase e BjussuMP-I, com Bt-CD, na razão (1:1, 1:5, 1:10 e 1:20, m/m). A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita no item 4.1.4.1. Uma unidade de atividade caseinolítica foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento na absorbância de 0,001 unidades/minuto.

Figura 31: INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA BjussuMP-I PELO EXTRATO AQUOSO DE *Pentaclethra macroloba* (EPema). A atividade anti-hemorrágica foi determinada após injeção via i.d. no dorso de camundongos (18-22 g) da mistura contendo veneno bruto de *B. jararacussu*/BjussuMP-I:EPemqa (1:1, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:30, m/m). A hemorragia foi avaliada conforme a metodologia descrita no item 4.2.1. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=5).

5.4 Ensaios Imunoenzimáticos

A Figura 32 mostra que a BjussuMP-I apresentou aproximadamente, 60% de reconhecimento pelos anticorpos anti-Neuwiedase (metaloprotease de 22 kDa de *B. neuwiedi*). Todos os outros venenos obtiveram entre 80 e 99% de reatividade cruzada.

5.5 Caracterização Estrutural da Metaloprotease

5.5.1 Análise da composição e seqüenciamento de aminoácidos

Na Tabela II verifica-se que a BjussuMP-I possui 546 resíduos de aminoácidos, com uma quantidade relativamente alta de ácido aspártico (92%), ácido glutâmico (54%) e glicina (43%).

5.5.2 Seqüenciamento completo da BjussuMP-I : cDNA e alinhamento múltiplo de aminoácidos

A Figura 33 mostra a seqüência do cDNA completa da BjussuMP-I, através de RT-PCR, o qual apresentou 1591bp que codificam para uma proteína madura com 547 aminoácidos, $PM \cong 61930,06$ e $pI \cong 5,6$, em valores teóricos.

O seqüenciamento de um fragmento peptídico direto da proteína isolada (E-Q-Q-K-F-P-Y-R-Y-V-E-I-V-V-V-D-R-R-H-V) confirmou que esta seqüência, no cDNA, codifica para a BjussuMP-I. Verifica-se na Figura 36, a conservação dos pré-pró-domínios, domínio metaloprotease, “cysteine switch”, domínio ligante de zinco, seqüência RGD e domínio contendo resíduos de cisteína.

O alinhamento múltiplo da estrutura primária da BjussuMP-I (Fig. 34) confirma os domínios comuns a esta classe de enzimas: pré-pró-domínio, metaloprotease (EQQKFP-), “cysteine switch” (P-K-M-C-G-V-T), domínio ligante de zinco HEXXH (HELGH), resíduos de cisteína (Cys) e a seqüência RGD (Arg-Gly-Asp).

Figura 32: REATIVIDADE CRUZADA DOS ANTICORPOS PARA METALOPROTEASES DE *Bothrops neuwiedi* (NEUWIEDASE) CONTRA A BjussuMP-I E OUTROS VENENOS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO. Microplacas foram preenchidas com diferentes concentrações da BjussuMP-I (40 e 80 $\mu\text{g/poço}$) e o ligante de anticorpos foi detectado de acordo com o item 4.3.3. A reatividade cruzada foi expressa em percentagem do sinal de absorvância resultado da ligação dos anticorpos com antígenos homólogos de *B. neuwiedi* (neuwiedase). Crotamina foi utilizada como controle negativo de antígeno. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

Tabela II: Composição em aminoácidos da metaloprotease (BjussuMP-I)

aa-H ₂ O	AA	PTC0150 4.025	PTC0150 4.026	MÉDIA (área)	pmol aplicado	Massa (ng)	mol%	Coef. Vari. (%)		número resíduo
115,089	Asp	34457	34745	34601,0	2882,46	331,74	16,88	0,6	Asp	92
129,116	Glu	20262	20471	20366,5	1684,02	217,43	9,86	0,7	Glu	54
87,079	Ser	9837	10034	9935,5	728,09	63,40	4,26	1,4	Ser	23
57,052	Gly	17637	19000	18318,5	1344,38	76,70	7,87	5,3	Gly	43
137,142	His	7218	8234	7726,0	629,05	86,27	3,68	9,3	His	20
156,189	Arg	11154	11757	11455,5	898,19	140,29	5,26	3,7	Arg	29
101,106	Thr	9970	10422	10196,0	870,86	88,05	5,10	3,1	Thr	28
71,079	Ala	12779	13036	12907,5	1066,21	75,78	6,24	1,4	Ala	34
97,118	Pro	9856	10606	10231,0	695,80	67,57	4,07	5,2	Pro	22
163,178	Tyr	10540	10585	10562,5	714,36	116,57	4,18	0,3	Tyr	23
99,134	Val	16000	16004	16002,0	1100,55	109,10	6,45	0,0	Val	35
131,166	Met	5573	5772	5672,5	400,49	52,53	2,35	2,5	Met	13
103,110	Cys	6545	6847	6696,0	907,81	93,60	5,32	3,2	Cys	29
113,161	Ile	14337	14229	14283,0	990,91	112,13	5,80	0,5	Ile	32
113,161	Leu	15431	14961	15196,0	991,65	112,22	5,81	2,2	Leu	32
147,178	Phe	7068	6970	7019,0	484,34	71,28	2,84	1,0	Phe	15
128,175	Lys	15807	16246	16026,5	686,77	88,03	4,02	1,9	Lys	22
Somatória:				227195,0	17075,91	1902,70	100,00			546

1	gagtttaaagtttaacgggtgagccagtagtgctacatttggaaaagaataaggggctcttt	60
1	E F K V N G E P V V L H L E K N K G L F	20
61	tctgaggattatagcgagaccactatagtcctcgatgggtcgtcagataactacgtatccc	70
21	S E D Y S E T H Y S P D G R Q I T T Y P	40
	→	
	Pré-pró-peptídeo	
71	Ccagttgaggatcactgttattaccacggcagaatagaaaatgacgcgagactctactgcc	130
41	P V E D H C Y Y H G R I E N D A D S T A	60
131	tcgatcagtgccctgcaatgggcttaaagggcacttttaaactccaaggtgagacttatctg	190
61	S I S A C N G L K G H F K L Q G E T Y L	80
191	atagagccgttaaagttatcggacagcgaggcgcatgcggtgtataaatacgaaaatggt	250
81	I E P L K L S D S E A H A V Y K Y E N V	100
251	gaaaaagaggatgaagctcctaaaatgtgtggggttactgaaactaactgggagtacgaa	310
101	E K E D E A P K M C G V T E T N W E Y E	120
	← → ←	
311	gagcctataaagaaagcgtccaagcttgtgggttacggcagagcaacagaaatttccgtac	370
121	E P I K K A S K L V V T A E <u>Q Q K F P Y</u>	140
	→	
371	cgctatgtggaaatagtggtagtcgtagacaggagaatgggtgacgaagtataatggcgac	430
141	<u>R Y V E I V V V V D R R M V</u> T K Y N G D	160
431	ttgaagaaaattaggaagtgggtctacgaacttgtaacattgtaaacaatatattaccgg	490
161	L K K I R K W V Y E L V N I V N N I Y R	180
491	agcttgaatgtacatgtcgactagtaggactggaaatctgggtccaagggtgacaaaatc	550
181	S L N V H V A L V G L E I W S K G D K I	200
551	acagttcaacctgactccgattataccctaaattcttttggggagtggcgcgaaagagat	610
201	T V Q P D S D Y T L N S F G E W R E R D	220
611	ctcctacccagaaaaaagcacgacaatgcacagttgcttacagctgtagttttcgatggc	670
221	L L P R K K H D N A Q L L T A V V F D G	240
671	cccacaatagggtcgagcatacatcgctggcatgtgtgaccctcgacacagcgctcggagtt	730
241	P T I G R A Y I A G M C D P R H S V G V	260
731	gtgatggatcatagcaaggaaaacttacaagtggctgtaacaatggcgcacgagctaggg	790
261	V M D H S K E N L Q V A V T M A <u>H E L G</u>	280
	→	
791	cataacctgggcatggaacatgacgagaaccaatgtcattgtgacgcgcctcgtgcgtc	850
281	<u>H N L G M E H</u> D E N Q C H C D A P S C V	300
	←	
851	atggcctccgtccttagtgtgtgttctatcatatgagttctcagattgttctcagaaccaa	910
301	M A S V L S V V L S Y E F S D C S Q N Q	320

Figura 33: Sequência do cDNA e de aminoácidos deduzidos da BjussuMP-I: Número de nucleotídeos (1591 bp) e aminoácidos (547). (→): Pré e pró-domínios; (→): Região “Switch cisteína”; (→): domínio metaloprotease; (sequência sublinhada): sequência de aminoácidos obtidos do sequenciamento direto; (→): sequência de aminoácidos (H-E-L-G-H-N-L-G-M-E-H) ligante de Zn^{++} ; (■): sequência RGD (Arg-Gly-Asp); (■): Resíduos de Cisteína (Cys).

911	tatcagacgtacctgacgaagcacaacccacagtgcattctcaacgaacctttgttaaca	970
321	Y Q T Y L T K H N P Q C I L N E P L L T	340
971	gtaagtgggaatgagttactcgaggctgggga [←] ggaatgtgactgcggcgccccagaaaat	1030
341	V S G N E L L E A G E F C D C G A P E N	360
1031	ccgtgttgcgacgcggcaacttgcaaattgcggccaggcgcacagtgcgccgaaggtctg	1090
361	P C C D A A T C K L R P G A Q C A E G L	380
1091	tgctgtgatcaatgtcgattcaaggagctggaaaaatttgccggcgctgcacgcggagat	1150
381	C C D Q C R F K G A G K I C R R A R G D	400
1151	aatccagacgatcgggtgcacggggcagagtgcggactgtcctcgtaatcgtttccatcga	1210
401	N P D D R C T G Q S A D C P R N R F H R	420
1211	aatgggtcaaccgtgcctgtataaccacggatactgttacaacggtaaattgtccgatcatg	1270
421	N G Q P C L Y N H G Y C Y N G K C P I M	440
1271	ttttatcaatgttacttcttatttcggctcaaacgccaccgtcgctgaggatgactgcttc	1330
441	F Y Q C Y F L F G S N A T V A E D D C F	460
1331	aataacaataagaaaggagacaagtacttttactgcaggaaagaaaatgaaaagtatatc	1390
461	N N N K K G D K Y F Y C R K E N E K Y I	480
1391	ccgtgcgccaagaagatgtgaagtgcggtaggcttttttgcgataacaaaaagtacccc	1450
481	P C A Q E D V K C G R L F C D N K K Y P	500
1451	tgctattataattactcagaggatctcgacttcggcatggctcgatcatggaaccaagtgt	1510
501	C H Y N Y S E D L D F G M V D H G T K C	520
1511	gctgatggaaaagtctgttctaaccgccagtgcgtagatgtcaacgaagcgataaaatca	1570
521	A D G K V C S N R Q C V D V N E A Y K S	540
1571	Acaaccgtattttcgttaatt	1591
541	T T V F S L I	547

Continuação da Figura 33

Enzima			Identidade (%)
BjussuMP-I	1	-----	50
VLAIP-A		MMQVLLVTISLAVFPYQGSSIIILESGNVNDYEVVYPQKVTAMPKGAVKQP	77
Berythracivase		MIQVLLVIIICLEAFYPYQGSSIIILESGNVNDYEVVYPRKVTALSKGAVHP-	75
Jararagina		-----ATRPKGAVQP-	77
Halyase		MIQVLLVTICLAAFPYQGSSIIILESGNVNDYEVVYPRKVTALPKGAVQP-	77
Catrocollastatin		MIQVLLVTICLAAFPYQGSSIIILESGNVNDYEVYIPRKVTALPKGAVQP-	76
HR1b		MIQVLLVTICLAVFPYQGSSIIILESGNVNDYEVMPQKVAALPKGAVQQ-	87
HF3		MIQVLLVTICLAAFPYQGSSIIILESGNVNDYEVVYARKVTALPKGAVQP-	78
Bojumet		-----TELPKGAVQP-	87
Contortrostatin		MIQVLLVTLCLAAFPYQGSSIIILESGNVNDYEVLYPQKVTALPKGAVQP-	76
BjussuMP-I	51	-----EFKVNGEPVVLHLEKNKGLFSEDYSETHYSPDGRQITITYP	100
VLAIP-A		EQKYEDAMQYEFKVKGEPPVLLLEKNKDLFSEDYSETHYSPDGREITITNP	
Berythracivase		--KYEDAMQYEFKVNGEPVVLHLEKNKGLFSEDYSEIHYSPDGREITITYP	
Jararagina		--KYEDAMQYEFKVNGEPVVLHLEKNKGLFSKDYSEIHYSPDGREITITYP	
Halyase		--KYEDAMQYEFKVNGEPVVLHLGKNKQLFSKDYSETHYSPDGREITITNP	
Catrocollastatin		--KYEDAMQYELKVNGEPVVLHLGKNKGLFSKDYSETHYSPDGREITITYP	
HR1b		--KYEDTMQYEFKVNGEPVVLHLEKNKGLFSEDYSETHYSPDGREITITNP	
HF3		--KYEDTMQYELKVNGEPVVLHLEKNKQLFSKDYSETHYSPDGREITITYP	
Bojumet		--KYEDAMQYEFKGNGEPPVVLHLEKNKGLFSEDYSETHYSPDGRQIITYP	
Contortrostatin		--KYEDTMQYEFKVNGEPVVLHLEKNKGLFSKDYSETHYSSDGRKITTNP	
*: * :***** * *** **:**** *.***: * * *			
BjussuMP-I	101	PVEDHCYYHGRIENDADSTASISACNGLKGHFKLQGETYLIIEPLKLSNSE	150
VLAIP-A		PVEDHCYYHGRIQNDADSSASISACNGLKGHFMLQGETYLIIEPLKLPDSE	
Berythracivase		LVEDHCYYHGRIQNDADSSASISACNGLKGHFKLQGEMYLIIEPLKLPDSE	
Jararagina		PVEDHCYYHGRIENDADSTASISACNGLKGYFKLQRETYFIEPLKLPDSE	
Halyase		PVEDHCYYHGRIENDADSTRSISACNGLKGHFKLQGETYLIIEPLKLSNSE	
Catrocollastatin		LVEDHCYYHGRIENDADSTASISACNGLKGHFKLQGEMYLIIEPLKLPDSE	
HR1b		PVEDHCYYHGRIQNDADSTASISACNGLKGHFKLQGEMYLIIEPLKFSNSE	
HF3		PVEDHCYYHGRIENDADSTASISACNGLKGHFKLQGETYFIEPLKLPNSE	
Bojumet		PFEDHCYYHGRIENDADSTASISACNGLKGHFKLQGETYLIIEPLKLSNSE	
Contortrostatin		PVEDHCYYHGRIQNDADSTASISACNGLKGHFKLQGETYLIIEPLKLSNSE	
.*****:*****:*****: * * * *:***: :.***			

Figura 34: Comparação da sequência de aminoácidos deduzida da BjussuMP-I com outras MPs hemorrágicas. (*) regiões totalmente conservadas; (:) variação/troca conservativa de um aa; (.) variação/troca não conservativa de um aa. As seqüências de aa da BjussuMP-I foram alinhadas com: VLAIP-A de *M. Lebetina* (gi: 61104775), Berythracivase de *B. erytromela* (gi: 17865171), Jararagina de *B. jararaca* (gi: 62468), Halyase de *G. halys* (gi: 607296954), Catrocollastatin de *C. atrox* (gi: 710354), HR1b de *T. flavoviridis* (gi: BAB92014), HF3 de *B. jararaca* (gi: 31742525), Bojumet de *B. jararacussu* (gi: 32306929) e Contortrostatin de *Agkistrodon contortrix* (gi: 7630286).

"Cys switch"

BjussuMP-I 151 AHAVYKYENVEKEDEAPKMC~~GV~~TETNWEYEEPIKKASKLVVTAEQQKFP- 200
 VLAIP-A AHAVYKYENVEKEDEAPKMC~~GV~~TQTNWESEDEPIKKASQLNLTPEQRRYLN
 Berythracivase AHAVFKYENVEKEDEAPKMC~~GV~~TETNWESEDEPIKKASLLNLTPEQQAYLD
 Jararagina AHAVFKYENVEKEDEAPKMC~~GV~~TQN-WKSYEPIKKASQLAFTAEQQRYD-
 Halyase AHAVYKYENILKEDEAPKMC~~GV~~TQN-WESYEPIKKASQLNLTPEQQRYN-
 Catrocollastatin AHAVYKYENVEKEDEALKMC~~GV~~TQN-WESYEPIKKASQLVVTAEHQKYN-
 HR1b AHAVYKYENVEKEEEEAPKMC~~GV~~TQTNWESEDEPIKKASKLVVTAEQQRFP-
 HF3 AHAVFKYENVEKEDEVFKMC~~GV~~TQTNWESEDEPIKKASQLVVTAEQQRYN-
 Bojumat AHAVYKYENVEKEDEAPKMC~~GV~~TETNWESEYEPPIKKASPSNLTPEQQKFS-
 Contortrostatin AHAVYKYENVEKEDEAPKMC~~GV~~TQTNWESEDEPIKKASQLNLTPEQQQGF-
 P-

****:****: **:*. *****: . *: ***** .*. *: : :

BjussuMP-I 201 -YRYVEIVVVDRRMVTKYNGDLKKIRKVVYELVNIVNNIYRSLNVHVAL 250
 VLAIP-A SPKYIKLVIVADYIMFLKYGRSLITIRTRIYEIVNINLVYRVLNIYIAL
 Berythracivase AKKYVEFVVVLDHGMYYKKYKDDLDKIKRRIYEIVNTMNEMFIPLNICVAL
 Jararagina PYKYIEFFVVVDQGTVTKNNGDLKIKARMYELANIVNEIFRYLYMHVAL
 Halyase PFRFVELVLVADKGMVTKNNGDLNLIKTRMYELANNLNDIYRYMYIHVAL
 Catrocollastatin PFRFVELFLVVDKAMVTKNNGDLKIKTRMYEIVNTVNEIYRYMYIHVAL
 HR1b R-RYIKLAIIVVDHGIIVTKHHGNLKKIRKWIYQLVNTINNIYRSLNIVLVAL
 HF3 HYKYIELVILADYRMVTKNNGDLGKIRTKIYEIVNINLVNEIFRYLYIRIAL
 Bojumat -PRYIEVAVVADHRMFKKYNLNTIRKVVHEMVNSMNGVYRSMDVHLSL
 Contortrostatin -QRYIELVVVADHRMFTKYNGNLNTIRIWWHELVNTMNVFYRPLNIRVSL
 P-

: : : . : : * * . * . *: : : : . * : * . : : : : *

BjussuMP-I 251 VGLEIWSKGDKITVQPSDYTLNSFGWEWRERDLLPRKKHDNAQLLTAVVF 300
 VLAIP-A LGLEIWNNGDKINVLPETKVTLDLFGKWRERDLLNRRKHDNAQLLTDINF
 Berythracivase TGLEIWSKGDKINVTSESFWFTLILFTNWRGADLLKRKSHDNAQLLTNTDF
 Jararagina VGLEIWSNGDKITVKPDVDYTLNSFAEWRKTDLLTRKKHDNAQLLTAIDF
 Halyase VGVEIWSGDKITVTPNVDDTLSSFAEWRKTHLLTRKKHDNAQLLTAIDF
 Catrocollastatin VGLEIWSNEDKITVKPEAGYTLNAFGWEWRKTDLLTRKKHDNAQLLTAIDL
 HR1b VYLEIWSKQNKITVQSASNVTLDLFGDWRESVLLKQRSHDCAQLLTITIDF
 HF3 VGIEIWSNADLSNVTLASDDTLASFGTWRTVLLKRKSHDNAQLLTAIDF
 Bojumat ANLEVWSKKDLINVQKDSRETLSFGWEWRERDLLPRISHDNAQLLTAVVF
 Contortrostatin TDLEVWSDQDLINVQPAAADTLEAFGDWRETLLNRI SHDNAQLLTAIEL
 P-

:*:*. : . * ** * ** ** : . ** ***** :

"motivo" ligante do Zn⁺⁺

BjussuMP-I 301 DGPTIGRAYIAGMCDPRHSGVGVMDHSHKENLQVAVTMAHELGHNLMGEHD 350
 VLAIP-A NGPTAGLGYVGSMCDPQYSAGIVQDHNKVNFLVALAMAHHEMGNLMGEHD
 Berythracivase DGSTIGRAHIGSMCHPYLSVGI IQDYSPVNLLVASTMAHEMGNLMGHHD
 Jararagina NGPTIGYAYIGSMCHPKRSVGIVQDYSPINLVVAVIMAHHEMGNLGIHHD
 Halyase NGPTIGYAYIASMCHPKRSVGIVQDYSPINLVSVVMAHEMGNLGIHHD
 Catrocollastatin DR-VIGLAYVGSMCHPKRSTGIIQDYSEINLVVAVIMAHHEMGNLGINHD
 HR1b DGPTIGKAYTASMCDPKRSVGIVQDYSPINLVVAVIMTHEMGNLGI PHD
 HF3 DGQTIGIANIASMCNQNKSGVGVMDYSPINLVVAVIMAHHEMGNLGINHD
 Bojumat DQQTIGRAYIAGMCDPRHSGVGVMDHSHKENLQVAVTMAHELGHNLMGEHD
 Contortrostatin DGETIGLANRGTMCDPKLSTGIVQDHSAINLWVAVTMAHEMGNLGI SHD
 P-

: . * . . **. *. *: : *: : : *: : : : : *

BjussuMP-I	351	ENQCHCDAPSCVMASVLSVVLSEYFSDCSQNYQTYLTKHNPQCILNEPL	400
VLAIP-A		EIHCTCGAKSCIMSGTLSCEASIRFSNCSREEHQKYLINKMPQCILNKPL	
Berythracivase		TGSCSCGDYPCIMGPTISNEPSKFFSNCSYIQWDFIMNHNPECILNEPL	
Jararagina		HSYCSCGDYACIMGATISHEPSTFFSNCSYIQWDFIMDHNPECIVNEPL	
Halyase		SGYCSCGDYACIMRPEISPEPSTFFSNCSYFECWDFIMNHNPECILNEPL	
Catrocollastatin		GNSCTCGGFPCIMSPMISDPPSELFNSKAYYQTFLLTDHKPQCILNAPS	
HR1b		TGSCSCGGYSCIMAPEISDQPSKLFNSKQAYQRYINYKPCILNEPL	
HF3		ENQCHCDAPSCVMASVLSVVLSEYFSDCSQNYQTYLTKHNPQCILNEPL	
Bojumet		GNQCHCDANS CIMSEELREQLSFESDCSQNYQTYLTDHNPQCMLNEPL	
		* * . . : * * : * : * : *	
BjussuMP-I	401	LT-----VSGNELLEAGEECCDGAPE---NPCCDAATCKLRPGAQCAEG	450
VLAIP-A		KTDIVSPAVCGNYLVELGEDCOCGSPRDCQNPCCNAATCKLTPGSQCADG	
Berythracivase		RTDII SPPVCGNELLEVGEECCDGTPEncRDPCCNATTCCKLTPGSQCVGE	
Jararagina		GTDII SPPVCGNELLEVGEECCDGTPEncQNECCDAATCKLKSGSQCGHG	
Halyase		GTDIVSPPVCGNELLEVGEECCDGTPEncQNECCDAATCKLKSGSQCGHG	
Catrocollastatin		GTDII SPPVCGNELLEVGEECCDGTPEncQNECCDAATCKLKSGSQCGHG	
HR1b		KTDIVSPPVCGNELLEAGEECCDGSPEncQYCCDAASCKLHSWVKCESG	
HF3		RTDIVSPPVCGNELLEMGECCDGSPRNCRDPCCDAATCKLHSWVECESG	
Bojumet		LT-----VSGNELLEAGE-----	
Contortrostatin		RTDIVSTPVSGNELLETGEESDFDAPA---NPCCDAATCKLTTGSQCADG	
		* . * * * : * * *	
BjussuMP-I		"motivo" desintegrina	
VLAIP-A	451	LCCDQCRFKGAGKICRRARGD-NPDDRCTGQSADCPNRFRHRNGQPCLYN	500
Berythracivase		ECCDQCKFRAGTVC RPANGECDDVSDLCTGQSAECPTDQFQRNGQPCQNN	
Jararagina		LCCDQCRFRKTGTETCRAAKHDCDLPESCTGQSADCPMDDFQRNGHPCQNN	
Halyase		DCCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHKNQGPCLDN	
Catrocollastatin		DCCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHKNQGPCLHN	
HR1b		DCCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHKNQGPCLDN	
HF3		ECCDQCRFRTAGTECRAAESECDIPESCTGQSADCPDRFRHRNGQPCLYN	
Bojumet		ECCDQCRFKGAGTECRAARSECDIAESCTGQSADCPD DFKRNGQPCLHN	
Contortrostatin		-----	
		LCCDQCKFMKEGTVCRRARGD-DLDDYCNGISAGCPRNPFA-----	
BjussuMP-I	501	HGYCYNGKCPIMFYQCYFLFGSNATVAEDDCFN NNKKGDKYFYCRKENEK	550
VLAIP-A		NGYCYSGTCPIMGKQCISLFGASATVAQDACFQFNSLGNEYGYCRKENGR	
Berythracivase		NGYCYNGKCPTMENQCIDLVGPKATVAEDSCFKDNQKGNDYGYCRKENGK	
Jararagina		YGYCYNGNCPIMYHQCYALFGADVYEAEDSCFKDNQKGNYGYGYCRKENGK	
Halyase		YGYCYNGNCPIMYHQCYALWGADVYEAEDSCFESNKKGNYGYGYCRKENGK	
Catrocollastatin		YGYCYNGNCPIMYHQCYDLFGADVYEAEDSCFERNQKGNYGYGYCRKENGN	
HR1b		HGYCYNGKCPIMFYQCYFLFGSNATVAEDDCFN NNKKGDKYFYCRKENEK	
HF3		YGYCYNGNCPIMYHQCYALFGSNATVAEDGCFEFNENGDKYFYCRKQSGV	
Bojumet		-----	
Contortrostatin		-----	

Continuação da Figura 34

BjussuMP-I	551	YIPCAQEDVKCGRLFCDN----KKYPCHYNYS-EDLDFGMVDHGTCKADG	600
VLAIP-A		KIPCAPQDVKCGRLYCFDNLPEHKNPCQIYYTPSDENKGMVDPGTKCGDG	
Berythracivase		KIPCEPQDVKCGRLYCKDNNSPGQNNPCKCIYFPRNEDRGMVLPGTCKADG	
Jararagina		KIPCAPEDVKCGRLYCKDNNSPGQNNPCKMFYSNDEHKGMVLPGTCKADG	
Halyase		KIPCAPEDVKCGRLYCKDNNSPGQNNPCKMFYSNEDEHKGMVLPGTCKDG	
Catrocollastatin		KIPCAPEDVKCGRLYCKDNNSPGQNNPCKMFYSNEDEHKGMVLPGTCKADG	
HR1b		YIPCAQEDVKCGRLFCDN----KKYPCHYNYS-EDLDFGMVDHGTCKADG	
HF3		NIPCAQEDVKCGRLFCHT----KKHPCDYKYS-EDPDYGMVDNGTCKADG	
Bojumet		-----	
Contortrostatin		-----	
BjussuMP-I	601	KVCS-NRQCVDVNEAYKSTTVFSLI	625
VLAIP-A		KACSSNRQCVDVNTAY-----	
Berythracivase		KVCS-NRHCVDVATAY-----	
Jararagina		KVCS-NGHCVDVATAY-----	
Halyase		KVCS-NGHCVDVATAY-----	
Catrocollastatin		KVCS-NGHCVDVATAY-----	
HR1b		KVCS-NRQCVDVNEAYKSTTVFSLI	
HF3		KVCS-NGHCVDVATAY-----	
Bojumet		-----	
Contortrostatin		-----	

Continuação da Figura 34

6.DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar as características funcionais e estruturais de uma metaloprotease purificada a partir do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*. O estudo sobre a purificação dos princípios ativos hemorrágicos dos venenos de serpentes iniciou-se em 1960 com a caracterização de duas frações hemorrágicas do veneno de serpente *Trimesurus flavoviridis* (OHSAKA et al., 1960).

As hemorragias local e sistêmica são sinais evidentes, provenientes do envenenamento por serpentes da família Viperidae. Um fato interessante é a alta concentração de enzimas proteolíticas, incluindo MPs, capazes de atuar direta ou indiretamente na produção da hemorragia local e/ou sistêmica (BJARNASON; FOX, 1994). Desde então, várias toxinas têm sido isoladas e caracterizadas quanto aos diferentes mecanismos pelas quais atuam na hemostasia (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

Apesar da aplicação de vários métodos no isolamento de proteases, especial atenção volta-se para cromatografias de afinidade e de interação hidrofóbica. Os processos de purificação que utilizaram o princípio da interação hidrofóbica para o isolamento de enzimas proteolíticas relatam não somente obtenção de consideráveis graus de recuperação, mas também homogeneidade das amostras (GRANET; BERTRAND, 1996).

O mecanismo da interação hidrofóbica ocorre por meio de ligações entre grupos hidrofóbicos da proteína e grupos localizados na matriz de separação, características estas, que contribuíram para a aplicação e padronização da metodologia utilizada para o isolamento da enzima. A BjussuMP-I foi isolada em sistema cromatográfico contendo NaCl (4 M), que promoveu a exposição dos grupos hidrofóbicos (Ala, Val e Ile) presentes na molécula. Assim, a alta afinidade da enzima pela matriz foi observada após a aplicação de um gradiente decrescente de NaCl (Figura 5).

As MPs do veneno de serpentes são capazes de induzir a hemorragia por mecanismos diversos. A proteólise dos componentes da matriz extracelular com conseqüente lesão tecidual é uma característica muito evidenciada com essa classe de enzimas (FRANCESCHI et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001). Durante as etapas de purificação da BjussuMP-I, localizaram-se as frações hemorrágicas através de ensaios *in vivo* para atividade hemorrágica em camundongos e proteolítica *in vitro*. Embora sem a precisão demonstrada com metodologias utilizando substratos sintéticos específicos para proteases, esses ensaios foram fundamentais para revelar a atividade enzimática específica para MPs e mostrou-se uma metodologia confiável, expressando uma boa correlação entre dose e efeito (Figs. 9, 10 e 11).

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que a inflamação também está associada ao quadro clínico do envenenamento botrópico. Para avaliar tais mecanismos, as MPs hemorrágicas e não hemorrágicas são interessantes modelos (TEIXEIRA et al., 2005). Há evidências de que o processo inflamatório induzido pelas MPs está associado à degranulação de mastócitos, migração de macrófagos e leucócitos, bem como expressão de vários mediadores, como por exemplo, as interleucinas (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF). Esses mecanismos foram bastante evidenciados com HF3, Jararagina e BaP1, MPs isoladas de *B. jararaca* e *B. asper*, respectivamente (RUCAVADO; NUNEZ; GUTIÉRRES, 1995; COSTA et al., 2002).

Os resultados da Figura 15 mostram que a metaloprotease isolada não foi capaz de induzir edema quando doses de 2,0 a 8,0 µg/g dessa fração foram injetadas por via intradérmica na pata de camundongos. A ausência de efeito edematogênico observado com a BjussuMP-I sugere a necessidade de estudar o processo inflamatório através de modelos farmacológicos mais específicos e sensíveis, pois altas concentrações da enzima torna inviável a mensuração do edema, ocasionando hemorragia e lesões teciduais nas patas dos animais.

Os efeitos de miotoxicidade produzido pelo veneno de várias serpentes, incluindo o gênero *Bothrops*, podem ser evidenciados através da liberação *in vitro* de creatina cinase muscular. Nos trabalhos realizados por NIKAI et al. (1985), OWNBY et al. (1994) e FRANCESCHI et al. (2000), observaram-se que as toxinas hemorrágicas são capazes de produzir lesão tecidual e mionecrose. ELIAS et al. (2000) demonstraram que a administração de doses crescente do veneno de *Bothrops jararacussu* por via intramuscular foi capaz de induzir miotoxicidade, com um aumento proporcional de creatina cinase plasmática.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstrando que comparativamente à fosfolipase A₂ (BthTX-I) isolada do mesmo veneno, 30 µg da fração BjussuMP-I, injetadas intramuscularmente, não induziram a miotoxicidade no músculo gastrocnêmio do camundongo, mesmo quando avaliados por longos períodos (Fig. 16). Efeitos estes que podem provavelmente estar relacionados ao mecanismo de ação distinto das MPs em relação às PLA₂s ou à dose de enzima utilizada nos experimentos.

Os distúrbios da coagulação observados no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* podem ser devido à ação de proteases fibrino(geno)líticas, e podem ser atribuídos a MPs (BRAUD; BON; WISNER, 2000; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). Contribuindo para o efeito hemorrágico, algumas MPs também têm demonstrado atividade proteolítica sobre alguns substratos, tais como o colágeno tipo IV, laminina e fibronectina (BJARNASON; FOX, 1994).

O efeito hemorrágico das MPs de serpentes pode ser em virtude da ação proteolítica sobre diferentes substratos, e também estar associado à liberação de substâncias vasoativas no sangue, como por exemplo, a trombomodulina (TM) e aos fatores coagulantes presentes no veneno (SERRANO et al., 1993b; ESTEVÃO-COSTA et al., 2000; KAWANO et al. 2002; LORÍA et al., 2003).

A maioria dos estudos com venenos estabelecem a associação da hemorragia com MPs hemorrágicas e, embora seja um efeito marcante, as MPs não hemorrágicas, em doses relativamente altas, também podem induzir este efeito, associado a mionecrose. A lesão tecidual induzida pela Neuwiedase, uma toxina não hemorrágica de *B. neuwiedi*, confirma a complexidade dos mecanismos fisiopatológicos da hemorragia, uma vez que a toxina induziu alterações morfológicas significantes, geralmente observadas com MPs hemorrágicas (RODRIGUES et al., 2001).

Nossos resultados confirmam uma possível correlação entre o efeito proteolítico da fração BjussuMP-I sobre o colágeno tipo IV e o efeito hemorrágico da enzima. Quando concentrações crescentes da metaloprotease foram incubadas com o colágeno, observou-se uma degradação parcial do mesmo (Fig. 18).

Os estudos realizados quanto às propriedades coagulantes e anticoagulantes das MPs mostram a especificidade dessas enzimas sobre alguns componentes do sangue, os quais são responsáveis pelo equilíbrio hemostático (GOULD et al., 1990; ESTEVÃO-COSTA et al., 2000; ANDREWS et al., 2001; LORÍA et al., 2003).

Os resultados apresentados na Figura 19 são pouco conclusivos com relação ao efeito da metaloprotease sobre o plasma. A metaloprotease não apresentou atividade coagulante direta, mas demonstrou efeito pró-coagulante indireto, onde se observou uma diminuição no tempo de coagulação do plasma em aproximadamente 50%, após a adição de CaCl_2 como agente coagulante. Este efeito pode ser parcialmente explicado em virtude da interação da MP com outros fatores da cascata de coagulação.

A existência de MPs que atuam por diferentes mecanismos sobre a cascata de coagulação, reforça a importância de um estudo mais detalhado da função dessas enzimas e o seu envolvimento direto na degradação do fibrinogênio, fibrina e interação com plaquetas.

Entre os fatores envolvidos no equilíbrio hemostático, o fibrinogênio participa diretamente na formação do coágulo, seja como precursor da fibrina ou como um mediador da adesão entre plaquetas. Entretanto, concentrações elevadas de fibrinogênio no plasma indicam que o mesmo está associado com várias doenças vasculares, em especial, a trombose (HANDLEY; HUGHES, 1997). Assim, terapias utilizando agentes trombolíticos não apenas no controle da síntese de fibrinogênio, mas também na dissolução do coágulo de fibrina, são fundamentais para o estudo e tratamento de doenças cardiovasculares.

Vários estudos relatam que as MPs podem induzir a hemorragia local e/ou sistêmica através da degradação dos componentes dos vasos sanguíneos ou agir sobre os constituintes da cascata da coagulação, como por exemplo, o fibrinogênio, fibrina ou plaquetas (PIRKLE; STOCKER, 1991; MARKLAND, 1991 e 1998; MARUYAMA et al., 1992a; KAMIGUTI et al., 1996; PIRKLE, 1998; BRAUD; BON; WISNER, 2000; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

A atividade fibrino(geno)lítica de algumas toxinas, inicialmente estudadas por Didisheim e Lewis (1960) relatam que esses compostos poderiam ser aplicados na clínica médica, em terapias trombolíticas, pois não eram inativados por inibidores no plasma humano. Atualmente, o estudo da hemostasia utilizando veneno de serpentes tem mostrado que várias toxinas podem ser úteis também no diagnóstico de distúrbios hemostáticos, como por exemplo, ensaios de protrombina, ativadores do fator V, VII e X, dentre outros (BRAUD; BON; WISNER, 2000; MARSH, 2001).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 20 nos testes de degradação do fibrinogênio, pela fração BjussuMP-I, a cadeia α foi totalmente hidrolisada, enquanto que a cadeia β somente foi hidrolisada na presença de altas concentrações da enzima.

A estabilidade estrutural e funcional das MPs depende essencialmente de fatores, tais como pH, temperatura, e influência de íons (GOMIS-RUTH; FRANS-XAVER, 1993;

MOURA-da-SILVA et al., 2003; XU et al., 2004). Assim, para avaliar esses parâmetros, o efeito fibrinogenolítico foi determinado com a enzima em diferentes condições de pH, temperatura e natureza dos íons. Os resultados apresentados nas Figuras 22, 23 e 24 confirmam a efetividade catalítica da metaloprotease em pH 7,0, na presença de Mg^{++} e Ca^{++} , a 37°C. Apesar de o Zn^{++} influenciar na função e conformação da enzima, os nossos resultados mostram que o metal não favoreceu o efeito fibrinogenolítico da enzima e, conseqüentemente na degradação da cadeia α do fibrinogênio. Segundo XU et al. (2004) esses resultados podem ser parcialmente explicados devido ao efeito de precipitação do $Zn(OH)_2$ em pH neutro a alcalino, sobre a enzima.

Na América Latina, o envenenamento por serpentes ainda é um problema de saúde pública. Os acidentes ofídicos, que geralmente ocorrem em áreas rurais constituem quadros fisiopatológicos complexos. Na maioria das vezes os efeitos locais e sistêmicos são irreversíveis em decorrência do tempo de exposição do veneno e da complexidade bioquímica e farmacológica do mesmo (GUTIÉRREZ, 2002).

Os trabalhos pioneiros conduzidos por Lacerda (1984) reforçaram a necessidade de produção de antivenenos, ou seja, incentivar a soroterapia antiofídica. Apesar das dificuldades em se obter antivenenos eficazes, esses trabalhos foram fundamentais para o estudo e desenvolvimento de substâncias com potencial efeito de neutralização total ou parcial do veneno e de seus constituintes. Por outro lado, a inibição dos compostos isolados da peçonha de serpentes promove estudos paralelos voltados para aplicações biotecnológicas. Pois as MPs de serpentes, podem ser modelos moleculares para compreender o efeito de inibidores naturais ou sintéticos.

Dessa forma, no trabalho desenvolvido em colaboração com JANUÁRIO et al. (2004), ficou demonstrado que o diterpenóide isolado de *Baccharis trimera*, denominado clerodane apresentou significativo efeito antiofídico sobre o veneno bruto de *B. jararacussu*,

neutralizando também com eficiência o efeito hemorrágico e proteolítico da BjussuMP-I (Figs. 29 e 30).

Pudemos também verificar em um outro estudo que o extrato aquoso da *Pentaclethra macroloba*, popularmente conhecida como “Pracaxi”, inibiu totalmente o efeito hemorrágico induzido pela BjussuMP-I (Fig. 31), trabalho este, que foi conduzido juntamente com Da-SILVA e colaboradores em 2005. Esses dados, de modo geral, permitiram avaliar o efeito antiofídico do extrato, sugerindo estudos complementares para a utilização do composto ativo no tratamento do envenenamento botrópico.

Para compreender melhor o mecanismo de ação da BjussuMP-I, avaliamos o efeito de inibidores sintéticos sobre a enzima. Nossos resultados são relevantes do ponto de vista biológico do envenenamento e podem possibilitar compreender o mecanismo de ação das MPs. A inibição da atividade enzimática, na presença de EDTA e EGTA, demonstra a dependência de metal para o efeito proteolítico sobre o fibrinogênio. A inibição da atividade fibrinogenolítica também foi observada na presença de Fenilmetilsulfonil Fluoreto (PMSF) e 1,10 Fenantrolina. Apesar de atuarem por mecanismos pouco conhecidos, os principais inibidores de MPs, como por exemplo os hidroximatos, carboxilatos, tióis, e análogos da tetraciclina, possuem mecanismo de ação semelhante, ou seja, interação especificamente no sítio catalítico da enzima, que contém o zinco acoplado (PETERSON, 2004). Esses inibidores, os quais são clinicamente utilizados no tratamento de doenças degenerativas, como por exemplo o câncer, têm demonstrado aplicação no envenenamento por serpentes, da espécie *B. asper* (GUTIÉRREZ, 2002).

O efeito direto de enzimas proteolíticas sobre o fibrinogênio é o tipo de ação mais comum de proteases do veneno de serpentes. Porém a atividade proteolítica sobre a fibrina é uma característica descrita com alguns constituintes isolados do veneno. Esses efeitos foram relatados com toxinas isoladas de *Lachesis muta muta* e *Bothrops neuwiedi* (RODRIGUES et

al., 2000; SANCHEZ et al., 2000). Recentemente, utilizando modelos *in vivo*, LI et al. (2002) observaram que um componente isolado do veneno de *Agkistrodon acutus* apresentou atividades antitrombótica e trombolítica, demonstrando uma provável aplicação no tratamento de doenças cardiovasculares. Em nossos resultados, na Figura 26 observamos o efeito proteolítico direto da metaloprotease sobre o coágulo de fibrina. Dessa forma, confirmou-se que se trata de um constituinte hemorrágico com ambas atividades, fibrinolítica e fibrinogenolítica, uma característica bastante verificada com esses compostos.

Está bem estabelecido que o equilíbrio hemostático é formado por três sistemas: as plaquetas, as proteínas da coagulação e o endotélio vascular. Em lesões endoteliais ou distúrbios da cascata de coagulação, as plaquetas são os primeiros tipos celulares que aderem ao subendotélio, processo denominado trombogénia. A formação do trombo, via final do processo de coagulação, evolui em etapas e se inicia com a exposição do colágeno e outros componentes da matriz extracelular. Uma vez ativadas por esses mecanismos, as plaquetas secretam um conjunto de substâncias que causam vasoconstrição, quimiotaxia, mitogênese e ativação de mais plaquetas (TEBET et al., 2000).

Recentemente, os mecanismos mais estudados sobre a fisiologia do processo trombogénico envolvem receptores expressos sobre a membrana plasmática plaquetária, como por exemplo, as glicoproteínas ($\alpha_2\beta_3$ /IIb/IIIa). Denominados integrinas, tais receptores controlam o metabolismo de plaquetas, intensificando a adesão e agregação entre esses tipos celulares e com células de outros tecidos (ANDREWS et al., 2001).

Os efeitos das MPs hemorrágicas do veneno de serpentes sobre a fisiologia de plaquetas conduziram várias pesquisas no estudo de novos mecanismos envolvidos com tais sintomas. Utilizando o veneno de serpentes concluiu-se que uma família de toxinas, que possuem a sequência RGD/ECD (Arginina-Glicina-Aspartato) em sua estrutura, ligam-se

especificamente às integrinas das plaquetas e, dessa forma, induzem o efeito anti-agregante (GOULD et al., 1990; NIEWIAROWSKI, et al., 1994).

Essas toxinas de baixa massa molecular passaram a ser denominadas desintegrinas, as quais estão presentes em vários venenos. Assim, não somente como um peptídeo, mas também fazendo parte das estruturas da maioria das MPs hemorrágicas, esses compostos têm sido utilizados para compreender diferentes mecanismos moleculares (HYNES, 1987 e 1992; ANDREWS; BERNDT, 2000).

Além de potentes antagonistas da agregação plaquetária, as desintegrinas ligam em subtipos de receptores $\alpha\beta$, importantes mediadores de adesão e desenvolvimento celular, processos de angiogênese e de apoptose celular (ANDREWS; BERNDT, 2000; HYNES, 1987 e 1992). Ensaios de inibição de agregação plaquetária *in vitro* e relatos clínicos, mostram a eficaz aplicação que esses compostos podem apresentar para compreender os mecanismos de alguns tumores (GAN; GOULD; JACOBS, 1988; DENNIS; HENZEL; PITTI, 1989; CORRÊA-Jr et al., 2002; SWENSON et al., 2004).

KAMIGUTI et al. (1997a e 1997b) comprovaram, utilizando a Jararagina, uma MP de 52 kDa da classe P-III, isolada de *Bothrops jararaca*, que a adesão entre plaquetas é um processo físico-químico, o qual envolve receptores específicos. Por outro lado, a utilização da enzima isolada auxiliou compreender o mecanismo de agregação, envolvendo diferentes agonistas, como por exemplo, o colágeno, trombina e ADP.

Diferentemente da maioria das desintegrinas, as quais inibem a agregação plaquetária por bloqueio específico das integrinas $\alpha_2\beta_3$, a Jararagina cliva a subunidade β_1 da integrina $\alpha_2\beta_1$, interferindo dessa forma, com uma das principais vias do metabolismo plaquetário, a fosforilação da tirosina de proteínas sinalizadoras, as quais regulam a adesão e agregação de plaquetas induzida pelo colágeno. Apesar de possuir que a interação da metaloprotease com

as plaquetas é dependente do domínio RGD e/ou ECD presente em MPs e peptídeos sintéticos (KAMIGUTI et al., 1997b).

Inúmeros modelos e ensaios farmacológicos comprovam a aplicação de enzimas proteolíticas do veneno de serpentes no tratamento de doenças cardiovasculares. A eficácia desses modelos farmacológicos é devido à ação sinérgica do efeito fibrino(geno)lítico, juntamente com o bloqueio sítio-específico da agregação plaquetária, fato comprovado por SANCHEZ et al (1997) e SWELSON; BUSH e MARKLAND (2000), os quais verificaram que a Fibrolase, uma metaloprotease quimérica, apresentou ambas atividades.

Para avaliar o efeito da metaloprotease sobre plaquetas, utilizou-se em nossos estudos uma metodologia *in vitro*, cujo ensaio possibilitou verificar uma significativa inibição da agregação plaquetária de 90 %, mesmo na presença de agonistas específicos, como por exemplo, ADP e colágeno (Figura 27). Características similares foram observadas com a Jararagina (MP hemorrágica da classe P-III) e Fibrolase, sugerindo características estruturais e funcionais que se conservam nessa classe de enzimas.

O estudo de proteínas e peptídeos animais com propriedades quimioterápicas, nos últimos anos, tornou-se uma área crescente na pesquisa de venenos. Algumas toxinas isoladas têm demonstrado eficiente propriedade bactericida, contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (HAEBERLI et al., 2000; STÁBELI et al., 2004). Os resultados apresentados nesse trabalho (Fig. 28) são originais com relação à BjussuMP-I e mostram a necessidade de estudos mais detalhados sobre o mecanismo de ação da enzima.

As características bioquímicas e funcionais da metaloprotease isolada nos levaram a utilizar anticorpos antineuwiedase de *B. neuwiedi* (Fig. 32). O reconhecimento parcial por estes anticorpos nos permitiu fazer algumas observações: a MP isolada apresentou atividade hemorrágica e uma massa molecular de 60000 Da, as quais são características evidenciadas

com metaloprotease da classe PIII. Sendo assim, ao contrário das MPs da classe PI (constituídas somente por pré-e pró-domínios e domínio metaloprotease), os domínios adicionais da classe PIII (desintegrina-like/rico em cisteína), provavelmente não foram reconhecidos pelos anticorpos antineuwiedase (MP da classe PI). Entretanto, pode-se sugerir a existência de algumas características estruturais que se conservam entre MPs hemorrágicas e não hemorrágicas, pois demonstram alguns aspectos farmacológicos e toxicológicos similares.

A análise estrutural de proteínas permite compreender a estrutura e a função biológica desses compostos, uma vez que estes assumem estruturas tridimensionais constituídas por diferentes domínios funcionais. Entretanto, para compreender os mecanismos envolvidos com a função biológica de cada proteína, requer-se, na maioria das vezes, o estudo e emprego de métodos, que permitam não somente a quantificação, determinação do grau de pureza da amostra e a estrutura parcial da molécula, mas também sejam complementares a outras metodologias, como por exemplo, o seqüenciamento automático do aminoácido N-terminal e a tecnologia do DNA recombinante (SHIVELY; PAXTON; LEE, 1989).

Com a determinação da seqüência completa do cDNA e o seqüenciamento deduzido de aminoácidos da BjussuMP-I, observamos no alinhamento múltiplo que a seqüência 1-Q-Q-K-F-P-Y-R-Y-V-E-I-V-V-V-V-D-R-R-M-V-20 não correspondeu ao seqüenciamento da região do N-terminal, mas sim a um fragmento interno da enzima. Com esta dedução, sugerimos uma autoproteólise, característica já observada com MPs, ou provavelmente a um bloqueio da molécula por piroglutamato, limitando a metodologia de seqüenciamento utilizada (MOURA-da-SILVA et al., 2003; TRUMMAL et al., 2005). Entretanto, esse resultado complementou nossos estudos, pois no alinhamento múltiplo da proteína, similaridades estruturais se conservaram, quando comparadas com outras MPs hemorrágicas de diferentes serpentes.

Para realizar o seqüenciamento da BjussuMP-I, primeiramente quantificaram-se os aminoácidos da molécula, que estão agrupados na Tabela II. No seqüenciamento direto da

enzima, utilizaram-se precisos 90 picomols da amostra, que foram suficientes para completar os 20 ciclos de análise em seqüenciador automático, uma vez que o método apresenta sensibilidade entre 10-100 picomols (SHIVELY; PAXTON; LEE, 1989).

É importante enfatizar que para relacionar a estrutura e a função das MPs, vários estudos, incluindo cDNA e seqüenciamento de aminoácidos, mostram que os domínios presentes/ausentes em cada classe de enzima, são características essenciais para a diversidade dos efeitos biológicos. Agrupadas na grande família das “Reprolysins”, as MPs da peçonha de serpentes, juntamente com as ADAMs (uma metaloprotease e uma desintegrina) constituem um grupo de enzimas com importantes similaridades funcionais e estruturais, onde muitos aspectos ainda não estão esclarecidos (FOX; SERRANO, 2005).

Atualmente, peculiaridades estruturais são observadas com as diferentes classes de MPs da peçonha de serpentes. A presença de ligações dissulfeto no domínio protease, por exemplo, sugerem a especificidade das enzimas da classe P I por determinados substratos. Nas classes P II são observados resíduos de cisteína (Cys) em regiões específicas do domínio metaloprotease, que supostamente controlam o processamento proteolítico e estabilidade dessas enzimas (FOX; SERRANO, 2005).

De modo geral, as MPs da classe P III possuem sete resíduos (Cys) conservados em regiões específicas do domínio metaloprotease, as quais correspondem aos aminoácidos nas posições (126, 166, 168, 173, 190 e 206). Entretanto, este não pode ser considerado o único critério de estabilidade/autólise dessa classe. Há importantes considerações quanto à influência do íon Ca^{++} e, provavelmente a disposição das ligações dissulfeto na molécula (MOURA-da-SILVA et al., 2003; FOX; SERRANO, 2005).

A maioria das MPs do veneno de serpentes é sintetizada e armazenada na forma de zimogênios. Essa propriedade, regulada pela seqüência P-K-M-C-G-V-T (“cysteine switch”/chave cisteína) também bloqueia o processo de autoproteólise das MPs. Localizada

entre a sequência sinal e o domínio catalítico da enzima, são regiões conservadas em todas as MPs (GRAMS et al., 1993).

No alinhamento de aminoácidos (Fig 34) verifica-se que a BjussuMP-I, conservou os sete resíduos de cisteína (Cys), nas posições (106, 125, 171, 314, 354, 356 e 361) do domínio metaloprotease, sugerindo uma pré-disposição da enzima à autólise. Porém não é uma característica suficiente para o processamento proteolítico, devendo-se considerar também a disposição das ligações dissulfeto no domínio protease, os quais podem contribuir para esse mecanismo (FOX; SERRANO, 2005). Nesse sentido, esses dados estruturais também sugerem que, apesar da BjussuMP-I pertencer à classe P III, a baixa atividade hemorrágica da enzima, deve-se à instabilidade estrutural ou a uma característica específica da mesma.

Em nossos resultados, além do pré e pró-domínios, a sequência traduzida do cDNA e o alinhamento múltiplo da enzima mostram que a BjussuMP-I conservou a sequência P-K-M-C-G-V-T-Q (Figs. 33 e 34). Com relação ao domínio catalítico, observamos no alinhamento de aminoácidos que a região de ligação ao Zn^{++} (H-E-X-X-H-X-X-X-X-H), conservada em todas as MPs, na BjussuMP-I está indicada pela sequência H-E-L-G-H-N-L-G-M-E-H.

Análises estruturais do domínio metaloprotease mostram que essa região, especificamente os resíduos de histidina (His147), juntamente com a serina (Ser176) e o ácido aspártico (Asp148) coordenam o íon Zn^{++} no sítio ativo, conferindo estabilidade à molécula (HITE et al., 1994; SHIMOKAWA et al., 1997; RAMOS; SELISTRE-de-ARAÚJO, 2004).

Importantes aspectos funcionais e estruturais voltam-se especificamente para os domínios desintegrina-símile e região rica em cisteína na região C-terminal da molécula. Pois são as principais regiões ou “motivos” que se conservam nas MPs e potencializam o efeito hemorrágico (KAMIGUTI; ZUZEL; THEAKSTON, 1998; RAMOS; SELISTRE-de-ARAÚJO, 2004). Os efeitos biológicos associados com o domínio desintegrina das MPs da classe P III já foram bastante estudados. Entretanto, apesar de poucas informações, a região

rica em cisteína também atua na inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno, portanto age sobre receptores $\alpha 2\beta 1$ das integrinas (JIA et al., 2000; KAMIGUTI et al., 2003).

Verificamos que a BjussuMP-I possui ambos domínios desintegrina-símile, contendo a sequência RGD (Arg-Gly-Asp) e a região contendo resíduos de cisteína. Tais características também foram evidenciadas com toxinas hemorrágicas de serpentes das espécies, *Agkistrodon contortrix laticinctus* e *Crotalus atrox*, cujos efeitos na adesão celular foram bastante explorados (SELISTRE-de-ARAÚJO; De-SOUZA; OWNBY, 1997; SHIMOKAWA et al., 1997).

Estudos recentes mostram que as bases moleculares dessas enzimas podem sofrer modificações pós-traducionais em regiões específicas. A N-glicosilação C-terminal, mais especificamente nos sítios (NCSI e NCSK), por exemplo, é uma característica específica de MPs hemorrágicas da classe P III (FOX; SERRANO, 2005). Apresentando tais modificações cita-se as MPs aelh, Trimerelysin, Jararagina e Rhodostomin, isoladas de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *Trimeresurus flavoviridis*, *Bothrops jararaca* e *Agkistrodon rhodostoma*, respectivamente (RAMOS; SELISTRE-de-ARAÚJO, 2004).

Considerando esses dados, ao avaliarmos o alinhamento múltiplo da BjussuMP-I com outras MPs hemorrágicas, observamos que a enzima não apresenta características de glicosilação, uma vez que conserva a sequência (DCSQ), no lugar da NCSI / NCSK (Fig. 34).

No alinhamento múltiplo com outras proteínas, deduziu-se que a BjussuMP-I possui homologia estrutural com MPs hemorrágicas da classe PII e PIII, presente em diferentes espécies de serpentes. Na análise estrutural, a enzima apresentou identidade de 75% com berythracivase de *B. erythromellas* (JUNQUEIRA-de-AZEVEDO et al., 2004), 76% com catrocollastatin de *C. atrox* (SHIMOKAWA et al., 1997) e contortrostatin de *Agkistrodon contortrix*, 77% com VLAIP-A de *M. Lebetina* (TRUMMAL et al., 2005), jararagina de *B.*

jararaca (PAINE et al., 1993) e halyase de *Gloydius halys* (DESHIMARU et al., 2005) e 78% com HF3 de *B. jararaca* (SILVA et al., 2004). Significante identidade de 87% foi observada com HR1b de *T. flavoviridis* (KISHIMOTO; TAKASHI, 2002) e bojumet de *B. jararacussu* (KASHIMA et al., 2000).

Em nossos estudos, na prática detectamos pela composição em aminoácidos que a BjussuMP-I possui significantes quantidades de resíduos polares e apolares, como já observados na Tabela II. Nesse sentido, pela análise estrutural da enzima e alinhamento de aminoácidos confirmou-se que a BjussuMP-I tem uma massa molecular de 61930,06 Da e pI de 5,6, com alta porcentagem de aminoácidos carregados negativamente.

Nossos resultados demonstraram que são relevantes para compreender o mecanismo de ação do veneno de *B. jararacussu*. Embora existam determinantes moleculares desconhecidos, a presença de domínios funcionais conservados nas MPs explicam os principais efeitos sobre os constituintes da matriz extracelular, fibrinogênio, fibrina e plaquetas.

Do ponto de vista tóxico confirmamos que a hemorragia local e sistêmica é provocada, principalmente pela ação de MPs. Por outro lado, a atividade bactericida foi essencial para propor novos mecanismos, contribuindo para elucidar o mecanismo de ação de outras MPs. Nesse sentido, mostra também que o veneno de serpentes é uma fonte rica em substâncias farmacologicamente ativas.

Os efeitos locais ou sistêmicos da intoxicação por venenos e/ou toxinas animais são mecanismos que abrangem múltiplos enfoques. Nas últimas cinco décadas de estudo dessas moléculas, muitos aspectos relacionados ao quadro clínico das intoxicações foram total/parcialmente resolvidos com estratégias terapêuticas efetivas.

Atualmente, um enfoque mais específico desses compostos mostra que algumas respostas celulares complexas podem ser compreendidas. Em virtude da especificidade que as

toxinas hemorrágicas de serpentes possuem sobre vários receptores celulares, os múltiplos sintomas do envenenamento incentivam diferentes áreas. Clinicamente algumas toxinas são utilizadas em terapias trombogênicas. Assim, na biotecnologia, por exemplo, sugerem novas aplicações e fornecem modelos estruturais para o desenvolvimento de substâncias com potencial farmacológico.

7. CONCLUSÕES

1-O processo de purificação, por cromatografia em Sephacryl S-200, interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose utilizados neste trabalho, constituíram uma metodologia eficiente para o isolamento da metaloprotease hemorrágica do veneno de *Bothrops jararacussu*. A fração BjussuMP-I representou 0,57% do veneno total. Na análise em SDS-PAGE verifica-se uma banda protéica principal de 60.000 Da, que corresponde à fração hemorrágica BjussuMP-I.

2-A metaloprotease isolada foi ativa preferencialmente sobre a cadeia α do fibrinogênio em pHs ácido a alcalino (4.5-8,0), sendo inativada em altas temperaturas e na presença de EDTA, EGTA, PMSF e 1,10 fenantrolina.

3-O efeito proteolítico sobre o colágeno confirma um sinergismo de ação da metaloprotease, que juntamente com a degradação e inibição dos componentes do sangue (fibrinogênio, fibrina e plaquetas), induzem a hemorragia. A metaloprotease isolada apresentou efeito pró-coagulante indireto sobre o plasma humano e inibiu a agregação plaquetária na presença de ADP e colágeno, efeitos evidenciados com outras toxinas dessa classe.

4-O efeito bactericida da metaloprotease sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas insere novos estudos sobre mecanismos de ação e aplicações para a enzima.

5-Os efeitos anti-hemorrágico e antiproteolítico dos inibidores (Bt-CD e EPema) sobre a BjussuMP-I mostram a relevância no estudo de compostos naturais com propriedades antiofídicas, e também sugerem a importância da enzima como modelo para o estudo de inibidores com propriedades farmacológicas.

6-O reconhecimento parcial pelos anticorpos antineuwiedase (*B. neuwiedi*) sugere a existência de similaridades estruturais entre a metaloprotease isolada de *B. jararacussu* e MPs que constituem outros venenos.

7-Com a determinação da sequência completa do cDNA e o sequenciamento deduzido de aminoácidos da BjussuMP-I, observamos no alinhamento múltiplo que a metaloprotease isolada possui homologia estrutural com MPs hemorrágicas de diferentes espécies de serpentes, conservando os domínios estruturais (pré-e pró-domínios, metaloprotease, desintegrina-símile) e resíduos de cisteína, característicos de MPs hemorrágicas. Assim, de acordo com a massa molecular, propriedades biológicas e características estruturais encontradas, concluímos que a BjussuMP-I pertence à classe PIII.

8-Este trabalho apresentou resultados originais, os quais possibilitaram compreender as MPs hemorrágicas quanto às características funcionais e estruturais, e também os princípios para estabelecer uma relação entre a estrutura e função das MPs do veneno de serpentes com MPs que regulam várias funções biológicas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERSHAM BIOSCIENCES DO BRASIL Ltda. **Hydrophobic Interaction Chromatography**. In: Protein Separation's Handbook Collections. Principles and Methods: Eddition AB, updated 2002, 102p.

ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C., 2000. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligants. **Toxicon**, v. 38, p. 775-791.

ANDREWS, R. K.; KAMIGUTI, A. S.; BERLANGA, O.; LEDUC, M.; THEAKSTON, R. D. G.; WATSON, S. P. The use of snake venom toxins as tools to study platelet receptors for collagen and von Willebrand factor. **Haemostasis**, v. 31, p. 155-172, 2001.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SAMPAIO, S.V.; CUNHA, O. A. B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) venom. **Toxicon**, v.35, p. 1043-1052, 2000.

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

ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MENDELBAUM, F. R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon**, v. 24, p. 943-946, 1986.

ASSAKURA, M. T.; SILVA, C. A.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a PIII metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 41, p. 217-227, 2003.

ATHERTON, D. Successful PTC amino acid analysis at the picomol level. **In: Techniques in Protein Chemistry** (HUGLY, T.E., ed.), San Diego, Academic Press, Inc., 1989, chapter 27, pp.273-283.

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emergency Medicine**, v. 13, p. 28-36, 2001.

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

BELLON, G.; MARTINY, L.; ROBINET, A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. **Oncology hematology**, v. 49, p. 203-220, 2004.

BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **J. Chromatography**, v. 336, p. 93-104, 1984.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 31, p. 1137-1150, 1993.

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

CIRILLI, M.; GALLINA, C.; GAVUZZO, E.; GIORDANO, C.; GOMIS-RUTH, F. X.; GORINI, B.; KRESS, L. F.; MAZZA, F.; PARADISI, M. P.; POCHETTI, G.; POLITI, V. 2 Å X-ray structure of adamalysin II complexed with a peptide phosphonate inhibitor adopting a retro-binding mode. **FEBS Lett.** v. 418, p. 319-322, 1997.

COMINETTI, M. R.; RIBEIRO, J. U.; FOX, J. W.; SELISTRE-de-ARAÚJO, H. S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops alternatus* that interacts with $\alpha 5\beta 1$ integrin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 416, p. 171-179, 2003.

CORRÊA Jr., M. C.; MARIA, D. A.; MOURA-da-SILVA, A. M.; PIZZOCARO, K. F.; RUIZ, I. R. G. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v. 40, p. 739-748, 2002.

COSTA, E. P.; CLISSA, P.B.; TEIXEIRA, C. F.; MOURA-da-SILVA, A. M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflamm.**, v. 26, p. 13-17, 2002.

Da-SILVA, J. O.; COPPEDE, J. S.; FERNANDES, V. C.; SNAT'ANA, C. D.; TICLI, F. K.; MAZZI, M. V.; GIGLIO, J. R.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Petacethra macroloba*. **J. Ethnopharmacol.**, 2005, In press.

De Clerck, Y. A. Interactions between tumor cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 1258-1268, 2000.

DENNIS, M. S., HENZEL, W. J., PITTI, R. M., LIPARI, M. T.; NAPIER, M. A.; DEISHER, T. A.; BUNTING, S.; LAZARUS, R. A. Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venom: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 2471-2475, 1989.

DESHIMARU, M.; ICHIHARA, M.; HATTORI, T.; KOBAYASHI, K.; TERADA, S. Primary structure of brevilysin L4, an enzymatically active fragment of a disintegrin precursor from *Gloydius halys brevicaudus* venom. **Toxicon**, v. 45, p. 571-580, 2005.

DUNN, R. D.; BROADY, K. W. Snake inhibitors of phospholipase A₂ enzymes. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1533, p. 29-37, 2001.

EGGERTSEN, G.; FOHLMAN, J.; SJÖQUIST, J. *In vitro* studies on complement inactivation by snake venoms. **Toxicon**, v. 18, p. 87-96, 1980.

ELIAS, S. C.; THATTASSERY, E.; MARTINEZ, A., M., B.; MELO, P. A. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1233-1235, 2002.

ESTEVIÃO-COSTA, M. I.; DINIZ, C. R.; MAGALHÃES, A.; MARKLAND, F. S.; SANCHEZ, E. F. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. **Thrombosis Research**, v. 99, p. 363-376, 2000.

FAMBROUGH, D. M.; HARTZELL, H. C. Acetylcholine receptors: numbers and distribution at neuromuscular junctions in rat diaphragm. **Science**, v. 176, 189, p.,1972.

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.

FOX, W. J.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M 12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969-985, 2005.

FRANCISCETTI, I. M. B.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. *Bothrops* sp. Snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp. Biochem. Phys.**, v. 119, p. 21-29, 1998.

FUJIMURA, S.; OSHIKAWA, K.; TERADA, S.; KIMOTO, E. Primary structure and autoproteolysis of brevilysin H6 from the venom of *Gloydius halys brevicaudus*. **J. Biochem.**, v. 128, p. 167-173, 2000.

FULY, A.; MACHADO, O. L. T.; ALVES, E. W.; CARLINI, C. R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) venom. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 1372-1380, 1997.

GAN, Z. R.; GOULD, R. J.; JACOBS, J. W.; FRIEDMAN, P. A.; POLOKOFF, M. A.; et al. Echistatin: A potent aggregation platelet inhibitor from the venom of the *Echis carinatus*. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 19827-19832, 1988

GASMI, A.; SRAIRI, N.; KAROUI, H.; AYEB, M.E. Amino acid sequence of VIF: identification in the C-terminal domain of residues common to non-hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1481, p. 209-212, 2000.

GOMIS-RUTH; FRANS-XAVER. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. **Embo J.**, v. 12, p. 4151-4157, 1993.

GOULD, R. J.; POLOKOFF, M. A.; FRIEDMAN, P. A.; HUANG, T. F.; HOLT, J. C.; COOK, J. J.; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrins: A family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v. 195, p. 168-171, 1990.

GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L. F.; MORODER, L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinase by a cysteine switch like mechanism. **Febs Lett.**, v. 335, p. 76-80, 1993.

GRANET-I.; BERTRAND, O. Separation of proteases: old and new approaches. **J. Chromatography B**, v. 684, p. 239-266, 1996.

GUTIÉRREZ, J. M. Clinical toxicology of snake bite in central america. **In: Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons** (Meir, J. e White, J. Eds). Florida: CRC Press, 1994.

GUTIÉRREZ, J. M. Clinical toxicology of snake bite in Central American. IN: Meier, J., White, J. (Eds.), **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. CRC Press, Boca Raton, p. 645-665, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en américa latina. **Rev. Biol. Trop.**, v. 50, p. 377-394, 2002.

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

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, 2005.

HAEBERLI, KUHN-N, L.; SCHALLER, J.; NENTWIG, W. Characterization of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae:Ctenidae). *Toxicon*, v. 38, p. 373-380, 2000.

HANDLEY, D. A.; HUGHES, T. E. Pharmacological approaches and strategies for therapeutic modulation of fibrinogen. *Thromb. Res.*, v. 87, p. 1-36, 1997.

HAYASHI, T.; SHIMOMURA, H.; TERASAKI, F.; TOKO, H.; OKABE, M.; DEGUCHI, H.; HIROTA, Y.; KITaura, Y.; KAWAMURA, K. Collagen subtypes and matrix metalloproteinase in idiopathic restrictive cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.*, v. 64, p. 109-116, 1998.

HEMAN-ACKAH, S. M. Microbial kinetics of drug action against gram-positive and gram-negative organism. II: effect of clindamycin on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* *J. Pharm. Sci.*, v. 64, p. 1612-1620, 1975.

HITE, L. A.; JIA, L-G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 308, p. 182-191, 1994.

HYNES, R.O. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell*, v. 48, p. 549-554, 1987

HYNES, R.O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, v. 69, p. 11-25, 1992.

ITZHAKI, R. F. and GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem*, v.9, p.401-410, 1964.

JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. L. R.; SATO, D. N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteaceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chem. Biol. Inter.**, v. 150, p. 243-251, 2004.

JIA, L.-G.; WANG, X.-L.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Function of cysteine-rich domain of the hemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: collagen targeting and inhibition of platelet aggregation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, p. 281-286, 2000.

JIANG, W.; BOND, J. S. Families of metallopeptidases and their relationship. **FEBS Lett.** v. 312, p.110, 1992.

JUNQUEIRA-de-AZEVEDO, I. L. M.; Da SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; HO, P. L. Identification and cloning of snake venom vascular endothelial growth factor (svVEGF) from *Bothrops erythromelas* pitviper. **Toxicon**, v. 44, p. 571-575, 2004.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.34, p. 627-642, 1996.

KAMIGUTI, A. S.; MOURA-da-SILVA, A. M.; LAING, G. D. et al. Collagen-induced secretion-dependent phase of platelet aggregation is inhibited by snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1335, p. 209-217, 1997a.

KAMIGUTI, A. S.; MARKLAND, F. S.; ZHOU, Q.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Proteolytic cleavage of the beta 1 subunit of platelet alpha2 beta1 integrin by the metalloproteinase jararhagin compromises collagen-stimulated phosphorylation of. **J. Biol. Chem**, v. 272, p. 32599-605, 1997b.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. G. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 853-862, 1998.

KAMIGUTI, A. S.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M.; FOX, J. W. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. **FEBS Lett**, v. 549, p. 129-134, 2003

KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S.; FARIA Jr, M.; XAVIER, M. A. S.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. *Biochimie*, v. 86, p. 211-219, 2004.

KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. Enzimas. In: Química Clínica-Técnicas de Laboratório-Fisiopatologia-Métodos de Análise. Ed Médica Panamericana, Buenos Aires, 1986, p.1273.

KAWANO, J.; ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Vascular endothelial cell injury induced by *Bothrops jararaca* venom; no significance of hemorrhagic metalloprotease. **Toxicon**, v. 40, p. 1553-1562, 2002.

KINI, R. M. Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? **Toxicon**, v. 34, p. 1287-1294, 1996.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, p. 265-293, 1992.

KISHIMOTO, M.; TAKAHASHI, T. Molecular cloning of HR 1a and HR 1b, high molecular factors, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **Toxicon**, v. 40, p. 1369-1375, 2002

LACERDA, J. B. **Leçons sur la venin des serpentes du Brésil**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984.

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

LEBER, T. M.; BALKWILL, F.R. Zymography: A single step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrates gels. **Anal. Biochem.**, v. 249, p. 24-28, 1997

LEE, C. Y.; TSENG, L. F. Distribution of *Bungarus multicinctus* venom following envenomation. **Toxicon**, v.3, p. 281-290, 1966.

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

LI, S.; JI, H.; CHENG, X.; Li, B.X.; Ng, T.B. Antithrombotic and thrombolytic activities of Agkisacutacin, a snake venom proteinase, in experimental models. **Gen. Pharmacol.**, v. 35, p. 179-187, 2002.

LORÍA, G.; RUCAVADO, A.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, D. G.; FOX, J. W.; ALAPE, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of “basparin A,” a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and Thrombosis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 418, p. 13-24, 2003.

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. Characterization of two hemorrhagic factors from the venom of *Bothrops neuwiedi* (Jararaca pintada). **Toxicon**, v. 22, p. 193-206, 1984.

MARIANO-O, A.; COELHO, A.L.; TERRUGGI, C.H.; SELISTRE-De-ARAUJO, H. S.; BARJA-FIDALGO, C.; De FREITAS, M. S. Alternagin-C, a non RGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur. J. Biochem.**, v. 24, p. 4799-4808, 2003.

MARKLAND, F. S. Inventory of α -and β -fibrinogenases from snake venoms. **Thromb. Haemost.**, v. 65, p. 438-443, 1991.

MARKLAND, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory, **Thromb. Haemost.**, v. 79, p. 668-674, 1998.

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

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (Jararaca) venom. **Toxicon**, v. 30, p. 853-864, 1992a.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; SHIMAYA, K.; MIHARA, H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes. **Toxicon**, v. 30, p. 1387-1397, 1992b

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

MEBS, D. Toxicity in animals: trends in evolution? **Toxicon**, v. 39, p. 87-96, 2001

MOURA-da-SILVA, A. M.; DELLA-CASA, M. S.; DAVID, A.S.; ASSAKURA, M. T.; BUTERA, D.; BEBRUN, P.; SHANNOM, J. D.; SERRANO, S. M. T.; FOX, J. W. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 409, p. 395-401, 2003.

NIEWIAROWSKI, S.; MACLANE, M. A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G. Disintegrins occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Seminars Hematol.** v. 31, p. 289-300, 1994.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIBA, M.; KATO, Y.; TAKENAKA, C.; MURAKAMI, T.; SHIGEZANE, S.; SUGIHARA, H. Isolation and Characterization of hemorrhagic factors a and b from the venom of the habu snake (*Trimeresurus microsquamatus*). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 838, p. 122-131, 1985.

OHSAKA, A.; IKESAWA, H.; KONDO, H.; KONDO, S.; UCHIDA, N. Hemorrhagic activities of habu snake venom and their relations to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 41, p. 478-486, 1960.

OUYANG, C.; TENG, C. M.; CHEN, Y. C. Physicochemical properties of α - and β -fibrinogenases of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 481, p. 622-630, 1977.

OUYANG, C.; TENG, C. M.; CHEN, Y. C. Properties of fibrinogen degradation products produced by α - and β -fibrinogenases of *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. **Toxicon**, v.17, p.121-126, 1979.

OUYANG, C.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v. 30, p. 945-966, 1992

OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R.; LI, Q. Presence of heat-stable hemorrhagic toxins in snake venoms. **Toxicon**, v. 32, p. 945-954, 1994.

OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R.; ODELL, G. V. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. **Toxicon**, v. 22, p. 227-233, 1984.

PAINE, DESMOND, H.P; THEAKSTON, R.D; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararagin from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22869-22876, 1992.

PAL, S. K.; GOMES, A.; DASGUBTA, S. C.; GOMES, A. Snake venom as therapeutic agents: from toxin to drug development. **Indian. J. Exp. Biol.**, v. 42, p. 1353-1358, 2002.

PANDYA, B. V.; BUDZYNSKI, A. Z. Anticoagulant proteases from western diamondback (*Crotalus atrox*) venom. **Biochemistry**, v. 23, p. 460-470, 1984.

PEREZ, J.C.; McKELLER, M. R.; PÉREZ, J.C.; SÁNCHEZ, E.E.; RAMIREZ, M.S. An internet database of crotaline venom found in the United States. **Toxicon**, v. 39. p. 621-632, 2001.

PETERSON, J. T. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. **Heart Failure Reviews**, v. 9, p. 63-79, 2004.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: An update inventory. On behalf of the scientific and standartization committee's registry of exogenous hemostatic factors. **Thromb. Haemost.**, v. 79, p. 675-683, 1998.

PIRKLE, H.; STOCKER, K. Thrombin-like enzymes from snake venoms: An inventory. For the sibcommittee on nomenclature of exogenous hemostatic factors of the scientific and standardization committee of the international society on thrombosis and haemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 65, p. 444-450, 1991.

POINDEXTER, K.; NELSON, N.; DUBOSE, R.F.; BLACK, R. A. CERRET, D. P. The identification of seven metalloproteinase-desintegrin (ADAM) genes from genomic libraries. **Gene**, v. 237, p. 61-70, 1999.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family-surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends in Genetics**, v. 16, p. 83-87, 2000.

RAND, M. L.; LEUNG, R.; PACKHAM, M. A. Platelet function assays. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 28, p. 307-317, 2003.

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

RODRIGUES, V.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of neuwidase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 381, p. 213-224, 2000.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-de ARAÚJO, H. S. Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteases using bioinformatic tools. **Toxicon**, v. 44, p. 529-538, 2004.

RUCAVADO, A.; NUNEZ, J.; GUTIÉRRES, J. M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 79, p. 245-254, 1995.

SÁNCHEZ, E. E.; SOLIZ, L. A.; RAMÍREZ, M. S.; PÉREZ, J. C. Partial characterization of a basic protein from *Crotalus molossus molossus* (northern blacktail rattlesnake) venom and production of a monoclonal antibody. **Toxicon**, v. 39, p. 523-537, 2001

SANCHEZ, E. F.; BUSH, L. R.; SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. Chimeric fibrolase: covalent attachment of an RGD-like peptide to create a potentially more effective thrombolytic agent. **Thromb. Res.**, v. 87, p. 289-302, 1997.

SANCHEZ, E. F.; SANTOS, C. I.; MAGALHAES, A.; DINIZ, C. R.; FIGUEIREDO, S.; GILROY, J.; RICHARDSON, M. Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (Bushmaster) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 131-141, 2000.

SAPRU, Z. Z.; TU, A. T.; BAILEY, G. Purification and characterization of a fibrinogenase from the venom of western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Biochim Biophys. Acta**, v. 747, p. 225-231, 1983.

SCARBOROUGH, R. M. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper. **J. Biol. Chem.**, v. 15, p. 1058-1065, 1993.

SELISTRE-de-ARAÚJO, H. S.; De-SOUZA, D. H. F.; OWNBY, C. L. Analysis of a cDNA sequence encoding a novel member of the snake venom metalloproteinase, disintegrin-like, cysteine-rich (MDC) protein family from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. **Biochim Biophys. Acta**, v. 1342, p. 109-115, 1997.

SERRANO, S. M. T.; MATOS, M. F. C.; MANDELBAUM, F. R.; SAMPAIO, A. M. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom-I. isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**, v. 31, p. 471-481, 1993a.

SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, A. M.; MANDELBAUM, F. R. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom-II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP and MSP 2. **Toxicon**, v. 31, p. 483-492, 1993b.

SHANNOM, J. D.; BARAMOVA, E. N.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 11575-11683, 1989.

SHEU, J. R.; HUANG, T. F. *Ex-vivo* and *in vivo* antithrombotic effect of triflavin, and RGD-containing peptide. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 58-62, 1994

SHIMOKAWA, K-I; SHANON, J. D.; JIA, L-G; FOX, J. W. Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cysteine-rich two domain protein from *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 343, p. 35-43, 1997.

SHIVELY, J.; PAXTON, R. J.; LEE, T. D. Highlights of protein structural analysis. **Trends Biochem. Sci.**, v. 14, p. 246-252, 1989.

SILVA, M. B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C. R. R.; JUNQUEIRA-de-AZEVEDO, I. L. M.; GUARNIERI, M. C.; LAZZAR, M. A., SAMPAIO, C. A.M.; POZNER, R. G.; VENTURA, J. S.; HO, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erithromelas* (Jararaca-da-Seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Bioch. J.**, v. 369, p. 129-139.

SILVA, C. A.; ZULIANI, J. P.; ASSAKURA, M. T.; MENTELE, R. A.; CAMARGO, C. M., TEIXEIRA, C. F. P.; SERRANO, S. M. T. Activation of $\alpha_M\beta_2$ -mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v 322, p. 950-956, 2004.

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 378, p. 201 – 209, 2000.

SOUZA, H. F.; IEMMA, M. R. C.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L. V. The disitegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha 2 \beta 1$ integrin-mediated cell adhesion. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p. 341-350, 2000.

SPINALE, F. G.; COKER, M. L.; BOND, B. R.; ZELLNER, J. L. Myocardial matrix degradation in the failing heart: a potential therapeutic target. **Cardiovascular Research**, v. 46, p. 225-238, 2000.

STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS G. B.; PIETRO, R. C. L. R., SELISTRE-de-ARAÚJO, H. S.; GÍGLIO, 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. 2881-2886, 2004.

STOCKER, K. F. Medical use of snake venom proteins, eds Kurt F. Stocker, 272 p. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990.

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

SWENSON, S.; BUSH, L. R.; MARKLAND, F. S. Chimeric derivative of fibrolase, a fibrinolytic enzyme from southern copperhead venom, possesses inhibitory activity on platelet aggregation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p. 227-237, 2000.

SWENSON, S.; COSTA, F.; MINEA, R.; SHERWIN, R. P.; ERNST, W.; FUJII, G.; YANG, D.; MARKLAND-Jr. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. **Mol. Cancer. Ther.**, v. 3, p. 499-511, 2004.

TAKATSUKA, H.; SAKURAI, Y.; YOSHIOKA, A.; KOKUBO, T.; USAMI, Y.; SUSUKI, M.; MATSUI, T.; TITANI, K.; YAGI, H.; MATSUMOTO, M.; FUJIMURA, Y. Molecular characterization of L-amino oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii*. **Biochem. et Biophys. Acta**, v. 1544, p. 266-277, 2001.

TANJONI, I.; BUTERA, D.; SPENCER, P.J.; TAKEHARA, H.A; FERNANDES, I.; MOURA-da-SILVA, A.M. Phylogenetic conservation on a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. **Toxicon**, v. 42, 7 p.809-816, 2003 (a).

TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; DELLA-CASA, M. S.; MARQUES-PORTO, R.; TAKEHARA, H. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; FERNANDES, I.; MOURA-da-SILVA, A. M. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 42, p. 801-809 2003 (b).

TEBET, M. A.; SAMESINA, N.; GRASSI, N. C.; LOURENÇO, U. R.; PEREZ, G. D. G. Inibidores da GPIIb-GPIIa. Tradução Fausto Feres. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 121p. (Série monografias Dante Pazzanese, I).

TEIXEIRA, C. F. P.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; ZAMUNER, S. F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 99, p. 1-4, 2005.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of World Health Organization**, v. 61, p. 949-956, 1983.

THOMAS, G. T.; LEWIS, M. P.; SPEIGHT, P. M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. **Oral Oncology**, v. 35, p. 227-233, 1999.

TRENTO, E. P.; GARCIA, O. S.; RUCAVADO, A.; FRANÇA, S. C.; BATALINI, C.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Inhibitory properties of the anti-biothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteases and myotoxins from *Bothrops asper* venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 62, p. 1521-1529, 2001.

TRUMMAL, K.; TÕNISMÄGI, K.; SIIGUR, E.; AASPÕLLU, A.; LOPP, A.; SILLAT, T.; SAAT, R.; KASAK, L.; TAMMISTE, I.; KOGERMAN, P.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, J. A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. **Toxicon**, v.46, p. 46-61, 2005.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Wath can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂? **Biochimie**, v. 82, p. 815-831, 2000.

VICTOR, W.M.; HINSBERGH-VAN. The endothelium: vascular control of haemostasis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 95, p. 198-201, 2001.

WANG, W. J.; HUANG, T. F. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Thromb. Haemost**, v. 87, p. 641-650, 2002.

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

WILLIS, T. W.; TU, A. T.; MILLER, C. W. Thrombolysis with a snake venom protease in a rat model of venous thrombosis. **Thromb. Res.**, v. 53, p. 19-29, 1989.

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

ZAGANELLI G. L.; ZAGANELLI, M. G. M.; MAGALHÃES, A. DINIZ, C. R.; LIMA, M. E. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jaracuçu (*Bothrops jararacussu*). **Toxicon**, v.34, p. 807-819, 1996.

ZHOU, Q.; HU, P.; RITTER, M. R.; SWENSON, S. D.; EPSTEIN, S. A. A. L.; MARKLAND, F. S. Molecular Cloning and Functional Expression of Contortrostatin, a Homodimeric Disintegrin from Southern Copperhead Snake Venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 375, p. 278-288, 2000.