UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise comparativa e caracterização bioquímica e funcional de duas
serinoproteases isoladas da peçonha de *Bothrops pirajai*

Danilo Luccas Menaldo

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise comparativa e caracterização bioquímica e funcional de duas
serinoproteases isoladas da peçonha de *Bothrops pirajai*

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: **Danilo Luccas Menaldo**

Orientadora: **Profa. Dra. Suely Vilela**

Ribeirão Preto

2012

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Menaldo, Danilo Luccas

Análise comparativa e caracterização bioquímica e funcional de duas serinoproteases isoladas da peçonha de *Bothrops pirajai*. Ribeirão Preto, 2012.

152 p. : il. ; 30 cm.

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

Orientadora: Vilela, Suely.

1. Peçonhas de serpentes. 2. *Bothrops pirajai*. 3. Enzimas proteolíticas. 4. Serinoproteases. 5. Isoformas. 6. Glicoproteínas. 7. Hemostasia. 8. Coagulação.

Ilustração da capa retirada de GRANTSAU, R. **As cobras venenosas do Brasil**. São Bernardo do Campo: Bandeirante, 1991.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: **Danilo Luccas Menaldo**

Título do trabalho: **Análise comparativa e caracterização bioquímica e funcional de duas serinoproteases isoladas da peçonha de *Bothrops pirajai*.**

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: **Profa. Dra. Suely Vilela**

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, aquelas que me dão forças e estão ao meu lado em todos os momentos. Eu não seria nada sem cada um de vocês!

Aos melhores pais do mundo, Sueli e Giuseppe, pelo amor, confiança e apoio em todos os sentidos. Não tenho palavras para descrever toda a gratidão que sinto, devo tudo e mais um pouco a vocês! Mãe, pai, amo vocês, sempre!

Aos meus queridos irmãos, Sandro e Bianca, pela amizade e companheirismo em todos os momentos. Apesar da distância, vocês estão em meus pensamentos todos os dias.

A toda a minha amada família, tios, tias, avós e primos, que sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial, sou muito grato por tudo!

Ao meu amor e melhor amiga, Bruna, pela dedicação, amizade, cumplicidade, carinho, paciência e por acreditar sempre em mim, às vezes mais do que eu mesmo. Minha vida é, sem dúvida alguma, muito mais feliz ao seu lado. Amo você, meu grude!

Aos meus grandes amigos de infância e de faculdade, de Ribeirão e de Rio Claro, que, de uma forma ou de outra, me acompanharam nesta jornada, me dando forças para seguir em frente sempre com muito bom humor e alegria. Estando perto ou longe, a amizade de vocês é essencial para mim.

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a participação e colaboração de diversas pessoas, a quem devo meus sinceros agradecimentos.

Aos meus queridos amigos de laboratório Carol, Norival, Tássia, Renata, Lucas, Johara, Clayton e Sil: caminhamos juntos e passamos por poucas e boas sem nunca deixarmos a peteca cair. Agradeço de coração a cada um de vocês pela amizade, ajuda em experimentos, jogos de vôlei, viagens para congressos, papos descontraídos e tudo mais que vivemos durante todo o tempo que passamos juntos. Saudades dessa época!

Um agradecimento especial à Carol, minha companheira de projeto, peçonha, experimentos, cromatografias, seriados, filmes, músicas, reclamações e indignações, comentários maldosos (ou não) e até de data de nascimento. Não sei o que o futuro profissional nos reserva, mas sei que vou sentir falta de trabalhar com você.

À Profa. Dra. Suely Vilela, pelo voto de confiança depositado em mim, permitindo que eu terminasse meu doutorado sob a sua orientação. Agradeço pela oportunidade, apoio e amizade que desenvolvemos neste período. É realmente um privilégio poder dizer que fui seu aluno.

Aos atuais alunos do SV1, Cássio, Marco Aurélio, Renato, Tati e Wallace, e também àqueles que tomaram rumos diferentes, como Lanuze e Raquel, agradeço pelo companheirismo, risadas, bolos de aniversário e demais momentos de descontração.

Aos técnicos Adélia, Luiz, Sante e Franco, pela convivência amistosa e ajudas técnicas indispensáveis para a conclusão do meu trabalho. Devo também um agradecimento especial à Vanessa pelo apoio mais do que importante para manter a organização geral do nosso laboratório.

A todos os professores que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, cedendo espaço em seus laboratórios, fornecendo ideias e sugestões ou dispondo de tempo precioso para auxiliar na interpretação dos resultados ou mesmo nos experimentos. Sem o apoio de vocês, este trabalho não seria possível.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Andreimar M. Soares, por ter me apresentado ao mundo da pesquisa, começando em 2005 com a iniciação científica que me levaria ao doutorado direto anos mais tarde. Obrigado pela sua orientação e ensinamentos no decorrer de todo este período e por fornecer meios para a realização deste trabalho durante boa parte de sua vigência.

Às alunas que me ajudaram nos experimentos em colaboração realizados em outros laboratórios, Denise (FCFRP), Juliana (FCFRP), Carla (UFU) e Laura (UFF), por deixarem de lado seus próprios projetos para auxiliar no meu, sou imensamente grato por tudo! Da mesma forma, agradeço à funcionária Karla (FCFRP) pela ajuda no sequenciamento N-terminal.

À bolsa de estudos fornecida pela CAPES, sem a qual meu doutorado não teria sido possível. Agradeço também à FAPESP pelo apoio financeiro que permitiu que eu participasse de congressos e eventos científicos, possibilitando grande crescimento profissional e pessoal.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, à Universidade de São Paulo como um todo e a todos os seus funcionários, por tudo o que me proporcionaram desde a época de graduação até agora na conclusão do meu doutorado. Os inúmeros momentos bons que vivi aqui estarão para sempre em minha memória.

*“Não importa onde você parou...
Em que momento da vida você cansou...
O que importa é que sempre é possível e necessário recomeçar.
Recomeçar é dar uma chance a si mesmo...
É renovar as esperanças na vida e o mais importante...
Acreditar em você de novo.
Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado...
Chorou muito? Foi limpeza da alma...
Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia...
Acreditou que tudo estava perdido? Era o início da sua melhora...
Pois é... Agora é hora de reiniciar...”*

Trecho do poema “Recomeçar”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

MENALDO, D.L. **Análise comparativa e caracterização bioquímica e funcional de duas serinoproteases isoladas da peçonha de *Bothrops pirajai***. 2012. 152 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

As peçonhas de serpentes possuem enzimas proteolíticas como metaloproteases e serinoproteases que afetam o sistema hemostático por diversos mecanismos. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização bioquímica e funcional de duas serinoproteases da peçonha de *Bothrops pirajai*, bem como uma análise comparativa entre estas enzimas. O processo de isolamento foi realizado por três etapas cromatográficas consecutivas (exclusão molecular em Sephacryl S-200 seguida por afinidade em Benzamidine Sepharose e fase reversa em C2/C18), resultando em duas serinoproteases distintas, denominadas BpirSP27 e BpirSP41 de acordo com suas massas moleculares determinadas por espectrometria de massas (27 e 41 kDa, respectivamente). Conforme estimativas por SDS-PAGE, a BpirSP27 mostrou redução de sua massa molecular de 32 kDa para 27 kDa após deglicosilação com PNGase F em condições desnaturantes, enquanto que a BpirSP41 apresentou maior conteúdo de carboidratos N-ligados (~42%), tendo sua massa molecular reduzida de 49 kDa para 28 kDa após deglicosilação. Ambas são enzimas ácidas, sendo o pI da BpirSP27 de aproximadamente 4,7 e o da BpirSP41 de 3,7. As sequências parciais de aminoácidos das serinoproteases apresentaram identidade de 61% entre si, e o alinhamento múltiplo de ambas mostrou alta similaridade com as sequências de outras serinoproteases de peçonhas de serpentes. As enzimas mostraram ações distintas sobre o fibrinogênio bovino, com a BpirSP27 agindo preferencialmente sobre a cadeia B β e a BpirSP41 sobre as cadeias A α e B β . As duas serinoproteases também foram capazes de degradar coágulos de fibrina e de sangue *in vitro* dependendo da dose e do tempo de incubação, com resultados superiores para a BpirSP41. Ambas as enzimas coagularam o plasma humano de forma dose-dependente, sendo que a BpirSP41 apresentou maior potencial coagulante, com dose coagulante mínima (DCM) de ~3,5 μ g contra 20 μ g para a BpirSP27. A perda da N-glicosilação por tratamento com PNGase F afetou a atividade coagulante das serinoproteases, sugerindo que os carboidratos N-ligados interferem na atividade catalítica destas enzimas. A atividade esterásica sobre o TAME foi avaliada em diferentes pHs e temperaturas, mostrando que as duas enzimas são bastante estáveis e perdem parte de suas atividades somente em pHs extremamente ácidos ou na temperatura extrema de 100°C. Além disso, as serinoproteases foram capazes de hidrolisar substratos cromogênicos como o S-2238, específico para enzimas trombina-símile, e outros como S-2222, S-2266 e S-2302, sendo que somente a BpirSP27 agiu sobre o substrato S-2251 para plasmina. Na presença do íon Cu²⁺ e após tratamento com inibidores específicos de serinoproteases (PMSF, benzamidina, leupeptina e aprotinina), as atividades das duas enzimas foram significativamente reduzidas, sendo a BpirSP41 menos sensível ao PMSF do que a BpirSP27. O ensaio sobre plaquetas lavadas mostrou que a BpirSP27 induziu maior agregação plaquetária em relação à BpirSP41, tanto na presença quanto na ausência do íon cálcio. Os ensaios de inibição da atividade hemolítica promovida pelo sistema complemento mostraram uma maior ação da BpirSP41 sobre as vias clássica/das lectinas em relação à BpirSP27, e ambas apresentaram efeitos inibitórios similares sobre a via alternativa. As serinoproteases apresentaram efeitos discretos sobre processos inflamatórios como a indução de edema e dor, promovendo ainda um pronunciado recrutamento de neutrófilos sem induzir aumento significativo na quantidade total de leucócitos no exsudato inflamatório, o que sugere que estas enzimas devem apresentar um papel menor na inflamação causada pela peçonha de *B. pirajai*. Os resultados obtidos sugerem que as diferenças encontradas entre as atividades das enzimas BpirSP27 e BpirSP41 devem estar relacionadas principalmente às suas pronunciadas diferenças estruturais, incluindo diferentes sequências de aminoácidos e taxas de glicosilação.

Palavras-chave: Peçonhas de serpentes. *Bothrops pirajai*. Enzimas proteolíticas. Serinoproteases. Isoformas. Glicoproteínas. Hemostasia. Coagulação.

ABSTRACT

MENALDO, D.L. **Comparative analysis and biochemical and functional characterization of two serine proteases isolated from *Bothrops pirajai* snake venom.** 2012. 152 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Snake venoms present proteolytic enzymes such as metalloproteases and serine proteases, which affect the hemostatic system through several mechanisms. This work aimed at the isolation and biochemical and functional characterization of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom, also providing a comparative analysis between these enzymes. The isolation procedure was performed by three consecutive chromatographic steps (molecular exclusion on Sephacryl S-200 followed by affinity on Benzamidine Sepharose and reverse phase on C2/C18) resulting in two distinct serine proteases, named BpirSP27 and BpirSP41 according to their molecular masses determined by mass spectrometry (27 and 41 kDa, respectively). As estimated by SDS-PAGE, BpirSP27 showed a reduction of its molecular mass from 32 kDa to 27 kDa after deglycosylation with PNGase F under denaturing conditions, while BpirSP41 presented a higher content of N-linked carbohydrates (~42%), having its molecular mass reduced from 49 kDa to 28 kDa after deglycosylation. Both are acidic enzymes, with pI of approximately 4.7 for BpirSP27 and 3.7 for BpirSP41. The partial amino acid sequences of these serine proteases showed 61% identity to each other, and multiple alignments of both revealed high homology with the sequences of other snake venom serine proteases. The enzymes showed different actions on bovine fibrinogen, with BpirSP27 acting preferably on the B β chain and BpirSP41 on both A α and B β chains. The two serine proteases were also able to degrade fibrin and blood clots *in vitro* depending on the dose and incubation period, with higher results for BpirSP41. Both enzymes coagulated the human plasma in a dose-dependent manner, and BpirSP41 showed a higher coagulant potential, with minimum coagulant dose (MCD) of ~3.5 μ g versus 20 μ g for BpirSP27. The loss of N-glycosylation by treatment with PNGase F affected the coagulant activity of *B. pirajai* serine proteases, suggesting that the N-linked carbohydrates interfere with the catalytic activity of these enzymes. Their esterase activity on TAME was assessed at different pHs and temperatures, showing that both enzymes are quite stable and lose some of their activities only at very acid pH values or at the extreme temperature of 100°C. Additionally, the serine proteases were able to hydrolyze chromogenic substrates including S-2238, specific for thrombin-like enzymes, S-2222, S-2266 and S-2302, with only BpirSP27 acting on the substrate S-2251 for plasmin. In the presence of Cu²⁺ ion and after treatment with specific serine protease inhibitors (PMSF, benzamidine, leupeptin and aprotinin), the activities of both enzymes were significantly reduced, and BpirSP41 showed to be less sensitive to PMSF than BpirSP27. The assay on washed platelets revealed that BpirSP27 induced greater platelet aggregation compared to BpirSP41 in the presence or absence of calcium ion. Tests of inhibition of the hemolytic activity promoted by the complement system showed a greater action of BpirSP41 on the classical/lectin pathways in comparison to BpirSP27, and both enzymes showed similar inhibitory effects on the alternative pathway. The serine proteases also presented mild effects on inflammatory processes such as the induction of edema and pain, promoting a pronounced neutrophil recruitment without inducing a significant increase in the total number of leukocytes present in the inflammatory exudate, which suggests that these enzymes should play a minor role in the inflammation caused by *B. pirajai* snake venom. The results suggest that the differences between the activities of BpirSP27 and BpirSP41 should be mainly related to their pronounced structural differences, including different amino acid sequences and rates of glycosylation.

Keywords: Snake venoms. *Bothrops pirajai*. Proteolytic enzymes. Serine proteases. Isoforms. Glycoproteins. Hemostasis. Coagulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático da cascata de coagulação sanguínea e do sistema fibrinolítico	6
Figura 2. Foto da espécie <i>Bothrops pirajai</i>	11
Figura 3. Vias de ativação do sistema complemento	16
Figura 4. Purificação das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 da peçonha de <i>Bothrops pirajai</i>	50
Figura 5. Determinação das massas moleculares das serinoproteases isoladas de <i>B. pirajai</i> por SDS-PAGE a 12%.	51
Figura 6. Determinação das massas moleculares das serinoproteases isoladas de <i>B. pirajai</i> por espectrometria de massas.	52
Figura 7. SDS-PAGE a 12% em condições desnaturantes das serinoproteases de <i>B. pirajai</i> tratadas ou não com enzimas deglicosilantes.	53
Figura 8. Focalização isoeletrica das serinoproteases de <i>B. pirajai</i> em gel de poliacrilamida a 7%.	54
Figura 9. Comparação entre as sequências parciais de aminoácidos das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 da peçonha de <i>B. pirajai</i>	55
Figura 10. Alinhamento múltiplo da sequência parcial de aminoácidos da BpirSP27 com sequências de outras serinoproteases de peçonhas de serpentes	56
Figura 11. Alinhamento múltiplo da sequência parcial de aminoácidos da BpirSP41 com sequências de outras serinoproteases de peçonhas de serpentes	57
Figura 12. Atividade fibrinogenolítica das serinoproteases de <i>B. pirajai</i>	58

Figura 13. Atividade fibrinolítica (A) e trombolítica (B) <i>in vitro</i> das serinoproteases de <i>B. pirajai</i> .	59
Figura 14. Influência de inibidores na atividade esterásica das serinoproteases de <i>B. pirajai</i> sobre o TAME.	61
Figura 15. Influência do pH na atividade esterásica das serinoproteases de <i>B. pirajai</i> sobre o TAME.	61
Figura 16. Influência da temperatura na atividade esterásica das serinoproteases de <i>B. pirajai</i> sobre o TAME.	62
Figura 17. (A) Efeitos da concentração das serinoproteases de <i>B. pirajai</i> na hidrólise do substrato cromogênico S-2238 (para enzimas trombina-símile). (B) Efeitos de cátions metálicos e inibidores na atividade hidrolítica das serinoproteases de <i>B. pirajai</i> sobre o substrato S-2238.	63
Figura 18. Efeitos da concentração das serinoproteases de <i>B. pirajai</i> na hidrólise dos substratos cromogênicos S-2222 (para fator Xa), S-2266 (para calicreína glandular e fator XIa), S-2302 (para calicreína plasmática, fator XIa e XIIa) e S-2251 (para plasmina).	64
Figura 19. Atividade coagulante dose-resposta das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 sobre o plasma humano.	66
Figura 20. Comparação da cinética de coagulação das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41.	66
Figura 21. Cinética de coagulação das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 na presença de inibidores específicos.	67
Figura 22. Cinética de coagulação das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 após deglicosilação com PNGase F.	67
Figura 23. Efeitos das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 sobre plaquetas lavadas.	68

Figura 24. Efeitos das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 sobre a atividade hemolítica das vias clássica/das lectinas do sistema complemento humano.....70

Figura 25. Porcentagens de inibição da atividade hemolítica das vias clássica/das lectinas do sistema complemento humano em função de concentrações crescentes das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41.....70

Figura 26. Efeitos das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 sobre a atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento humano.71

Figura 27. Porcentagens de inibição da atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento humano em função de concentrações crescentes das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41.....71

Figura 28. Atividade edematogênica induzida pelas serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41.....74

Figura 29. Avaliação da hiperalgesia induzida pelas serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41.....74

Figura 30. Contagem total dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após 6 horas e 24 horas da administração das serinoproteases de *B. pirajai*.....75

Figura 31. Contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após 6 horas e 24 horas da administração das serinoproteases de *B. pirajai*.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Serinoproteases isoladas de peçonhas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	10
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BApNA	N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida
BSA	Albumina de soro bovino
CID	Dissociação induzida por colisão
DCM	Dose coagulante mínima
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
ESI	Ionização por eletrospray
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC50	Concentração da enzima capaz de inibir 50% da atividade hemolítica promovida pelo sistema complemento
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeos
MAC	Complexo de ataque à membrana
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo
MASPs	Serinoproteases circulantes associadas à MBL
MBL	Lectina tipo-C ligante de manose
Mr	Massa molecular relativa
MS	Espectrometria de massas
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Salina tamponada com fosfato
PG	Prostaglandina

pI	Ponto isoelétrico
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SHN	Soro humano normal
SVSPs	Serinoproteases de peçonhas de serpentes
SVTLEs	Enzimas trombina-símile de peçonhas de serpentes
t_{1/2}	Tempo (em segundos) necessário para ocorrer lise de 50% das hemácias presentes no meio reacional
TAME	N- α -tosil-L-arginina metil éster
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
tPA	Ativador de plasminogênio tipo tecidual
uPA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
VA	Via alternativa do sistema complemento
VC	Via clássica do sistema complemento
VL	Via das lectinas do sistema complemento
WP	Plaquetas lavadas

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Acidentes ofídicos no Brasil: epidemiologia e quadro clínico	1
1.2. Composição de peçonhas de serpentes	3
1.3. Peçonhas de serpentes e o sistema hemostático	4
1.4. Serinoproteases de peçonhas de serpentes	7
1.5. <i>Bothrops pirajai</i>	11
1.6. Aplicações e potencial terapêutico de serinoproteases	12
1.7. O sistema complemento e peçonhas de serpentes	14
1.8. O processo inflamatório e peçonhas de serpentes	18
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivos gerais	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Materiais	27
3.1.1. Peçonha e outros materiais	27
3.1.2. Animais	27
3.1.3. Plasma e soro humano	27
3.2. Isolamento das serinoproteases de <i>B. pirajai</i>	28
3.2.1. Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200	28
3.2.2. Cromatografia de afinidade em Benzamidine Sepharose	29
3.2.3. Cromatografia de fase-reversa em coluna C2/C18	29
3.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	30
3.2.5. Quantificação de proteínas	30
3.3. Caracterização bioquímica	31
3.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes	31
3.3.2. Determinação da massa molecular	31

3.3.2.1. Determinação por SDS-PAGE.....	31
3.3.2.2. Determinação por MALDI-TOF MS.....	31
3.3.3. Ensaio de deglicosilação.....	32
3.3.4. Focalização isoeletrica.....	33
3.4. Caracterização estrutural.....	34
3.4.1. Sequenciamento N-terminal.....	34
3.4.2. Sequenciamento por espectrometria de massas.....	34
3.4.2.1. Sequenciamento realizado na Universidade de Barcelona.....	34
3.4.2.2. Sequenciamento realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto.....	36
3.4.3. Alinhamento múltiplo das sequências parciais obtidas.....	37
3.5. Caracterização enzimática.....	38
3.5.1. Atividade fibrinogenolítica.....	38
3.5.2. Atividade fibrinolítica.....	38
3.5.3. Atividade trombolítica.....	39
3.5.4. Atividade esterásica.....	39
3.5.5. Atividade pró-coagulante.....	40
3.6. Caracterização funcional.....	40
3.6.1. Atividade coagulante sobre plasma.....	40
3.6.1.1. Determinação da dose coagulante mínima (DCM).....	40
3.6.1.2. Determinação da atividade coagulante por ensaio cinético.....	41
3.6.2. Efeitos sobre plaquetas.....	41
3.6.3. Efeitos sobre o sistema complemento.....	42
3.6.3.1. Via clássica/via das lectinas (VC/VL).....	42
3.6.3.2. Via alternativa (VA).....	43
3.6.3.3. Ensaio de atividade hemolítica por método cinético.....	43
3.6.3.4. Quantificação de endotoxinas nas amostras.....	44
3.6.4. Efeitos pró-inflamatórios.....	45
3.6.4.1. Atividade edematogênica.....	45
3.6.4.2. Hiperálgia.....	46
3.6.4.3. Análise do exsudato inflamatório peritoneal.....	46
3.7. Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Isolamento das serinoproteases de <i>B. pirajai</i>	49
4.2. Determinação das massas moleculares.....	51
4.3. Determinação do grau de N-glicosilação.....	53

4.4. Determinação do ponto isoelétrico (pI)	54
4.5. Sequenciamento parcial das serinoproteases	54
4.6. Atividade fibrinogenolítica.....	58
4.7. Atividade fibrinolítica e trombolítica	59
4.8. Atividade esterase sobre o TAME	60
4.9. Atividade pró-coagulante.....	62
4.10. Atividade coagulante sobre plasma.....	65
4.11. Efeitos sobre plaquetas	68
4.12. Efeitos sobre o sistema complemento	69
4.13. Efeitos pró-inflamatórios	72
 5. DISCUSSÃO	 77
 6. CONCLUSÕES	 104
 REFERÊNCIAS	 108
 ANEXOS	 Erro! Indicador não definido.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes ofídicos no Brasil: epidemiologia e quadro clínico

Os acidentes causados por serpentes constituem um grave problema de Saúde Pública em países tropicais e subtropicais, devido à incidência, gravidade e sequelas deixadas na vítima. Mundialmente, estima-se que ocorrem entre 1,2 e 5,5 milhões de acidentes ofídicos por ano, com 400.000 a 1,8 milhões de casos graves de envenenamento e 20.000 a 94.000 mortes (KASTURIRATNE et al., 2008).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, o número de notificações de acidentes por serpentes no ano de 2010 foi de 29.635 casos, acometendo com maior frequência jovens adultos do sexo masculino que trabalham na zona rural das regiões Norte e Nordeste entre os meses de janeiro a maio, época de calor e chuvas. As partes do corpo mais atingidas por picadas de serpentes são os pés e pernas e a maioria dos acidentes é classificada como leve, com letalidade geral baixa (0,5%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A fauna brasileira possui diversas famílias de serpentes, dentre as quais, somente duas abrangem as espécies consideradas peçonhentas: a família Viperidae, destacando-se a subfamília Crotalinae, à qual pertencem os gêneros *Crotalus* (cascavéis), *Bothrops* (jararacas) e *Lachesis* (surucucus); e a família Elapidae, que engloba o gênero *Micrurus* (corais verdadeiras) (MELGAREJO, 2003). Destes quatro gêneros de serpentes peçonhentas, verifica-se o predomínio do acidente botrópico, que constitui aproximadamente 82% dos casos notificados no Brasil, seguidos do crotálico (13,5%), laquélico (3,4%) e elapídico (1,1%). Embora relativamente frequentes, os acidentes por serpentes não peçonhentas, em sua maioria, não representam acidentes graves, e por isso, são considerados de menor importância médica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A fisiopatologia do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizada pela ação proteolítica (que causa lesões locais e destruição tecidual), coagulante (que induz incoagulabilidade sanguínea pelo consumo de fibrinogênio) e hemorrágica (pela liberação de substâncias hipotensoras e lesões na membrana basal dos capilares) da peçonha botrópica. O quadro clínico destes acidentes caracteriza-se principalmente por manifestações locais como dor e edema de caráter

progressivo, com surgimento frequente de equimoses, lesões cutâneas bolhosas e sangramentos no local da picada, além de necrose tecidual e formação de abscessos nos casos mais graves. As principais complicações locais são decorrentes da necrose e da infecção secundária que podem levar à amputação e/ou ao comprometimento funcional do membro acometido. Já as manifestações sistêmicas incluem hemorragias locais e à distância, com sangramentos em pele e mucosas, gengivas, narinas, boca e urina. As complicações sistêmicas mais comuns são o choque, a insuficiência renal aguda, a septicemia e a coagulação intravascular disseminada, sendo causas frequentes de óbito (PINHO; PEREIRA, 2001; CRUZ et al., 2009).

Diferentemente do acidente botrópico, a peçonha crotálica quase não produz lesão local, apresentando ação sistêmica mais acentuada devido a três atividades principais: (i) atividade neurotóxica, com ação periférica, causando paralisia flácida da musculatura esquelética, principalmente ocular, facial e às vezes, da respiração, com consequente insuficiência respiratória; (ii) atividade coagulante, provocando a ocorrência de sangramento e distúrbios da coagulação por consumo de fibrinogênio; e (iii) atividade miotóxica sistêmica, causando lise generalizada de músculo esquelético, podendo evoluir para insuficiência renal aguda (PINHO; PEREIRA, 2001).

O envenenamento laquético é caracterizado por um quadro clínico semelhante ao do acidente botrópico, porém usualmente mais severo, com ação proteolítica, coagulante, hemorrágica e neurotóxica. Já o acidente elapídico é caracterizado pela precocidade dos sintomas de envenenamento, devido principalmente à presença de neurotoxinas de baixo peso molecular que são rapidamente absorvidas e difundidas para os tecidos. Tal peçonha produz bloqueio neuromuscular pós-sináptico, competindo com a acetilcolina pelos receptores colinérgicos e levando à paralisia muscular (PINHO; PEREIRA, 2001).

Deste modo, as características clínicas e a patogenia dos envenenamentos ofídicos estão relacionadas à composição das peçonhas de serpentes, e consequentemente variam tanto entre espécies de gêneros distintos, quanto entre espécies diferentes de um mesmo gênero. No caso do envenenamento botrópico, por exemplo, as manifestações clínicas observadas, como lesões locais, destruição tecidual e alterações da coagulação, estão relacionadas à ação isolada ou conjunta

de diversos componentes da peçonha, os quais podem apresentar ação proteolítica, coagulante, hemorrágica, miotóxica, entre outras.

1.2. Composição de peçonhas de serpentes

A composição das peçonhas de serpentes resulta da interação de vários fatores, como por exemplo, da genética, idade, sexo, alimentação e localização do espécime, levando a um produto biológico eficiente e de natureza complexa que tem como principais objetivos a imobilização, a morte e a promoção da digestão inicial de presas (MEBS, 1999; MACKESSY, 2009). Estas peçonhas são formadas por (i) compostos orgânicos, como aminas biogênicas, aminoácidos, carboidratos, citratos e nucleosídeos, (ii) compostos inorgânicos, como os íons sódio, zinco, cálcio e outros, além de (iii) proteínas e peptídeos, que correspondem a mais de 90% da massa seca da peçonha. Dentre os componentes protéicos estão enzimas como fosfolipases A_2 , L-aminoácido oxidases e enzimas proteolíticas, como metaloproteases e serinoproteases (MARKLAND, 1998; VARANDA; GIANNINI, 1999).

As fosfolipases A_2 (PLA_2 s, E.C. 3.1.1.4) são enzimas dependentes de Ca^{2+} que catalisam a hidrólise de fosfolipídios da membrana das células, contribuindo para a formação de edema pela liberação de mediadores inflamatórios. Estas enzimas, comumente abundantes em peçonhas de serpentes da família Viperidae, induzem uma grande variedade de efeitos tóxicos e farmacológicos, incluindo miotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hemólise, hipotensão, anticoagulação, edema e efeitos diversos sobre a agregação plaquetária e inflamação (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1997; HARRIS et al., 2000; SINGH et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2003; SOARES et al., 2004).

As L-aminoácido oxidases (LAOs, E.C. 1.4.3.2) são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa de substratos L-aminoácidos aos α -cetoácidos correspondentes, com produção de peróxido de hidrogênio e amônia. Acredita-se que a toxicidade destas enzimas esteja relacionada principalmente à produção de peróxido de hidrogênio, e suas ações tóxicas mais estudadas incluem os efeitos sobre plaquetas, indução de apoptose, hemorragia, ação antibacteriana e antiparasitária (DU; CLEMETSON, 2002).

As metaloproteases de peçonhas de serpentes são enzimas de caráter proteolítico dependentes de Zn^{2+} , capazes de degradar proteínas da membrana dos vasos, permitindo o extravasamento de sangue e sendo assim as principais responsáveis pelo efeito hemorrágico característico de envenenamentos por serpentes da família Viperidae (FOX; SERRANO, 2005). Os efeitos tóxicos destas enzimas também estão relacionados à patogenia da mionecrose local e dano tecidual (GUTIÉRREZ et al., 1995a; RUCAVADO et al., 1999) e às reações inflamatórias (TEIXEIRA et al., 2005; ZYCHAR et al., 2010).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) são enzimas que atuam sobre uma variedade de componentes da cascata de coagulação e sobre os sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina, causando um desequilíbrio hemostático na presa (SERRANO; MAROUN, 2005). A grande maioria destas enzimas é capaz de promover coagulação sanguínea e se assemelham, ao menos em partes, à trombina, uma protease multifuncional com papel essencial na coagulação, sendo desta forma denominadas enzimas trombina-símile de peçonhas de serpentes (SVTLEs) (PIRKLE, 1998; CASTRO et al., 2004). Além de afetarem a hemostasia pela ativação de fatores de coagulação e indução de agregação plaquetária (TENG; KO, 1998; SANTOS et al., 2000), as SVSPs também podem apresentar outras atividades biológicas, como sobre o sistema complemento (YAMAMOTO et al., 2002) e nervoso (GUO et al., 1998; WU et al., 2001).

Diversas outras proteínas e peptídeos são encontrados em peçonhas de serpentes, porém, normalmente em menores quantidades, como hialuronidases, nucleotidases, fatores de crescimento neural (NGFs), lectinas tipo C, peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), desintegrinas, neurotoxinas, entre outros. Cabe ressaltar que nem todos estes componentes estão presentes em todas as peçonhas (MARKLAND, 1998).

1.3. Peçonhas de serpentes e o sistema hemostático

Como já descrito anteriormente, o envenenamento botrópico causa vários distúrbios fisiopatológicos, incluindo transtornos sistêmicos da hemostasia relacionados com a ativação do fator X e protrombina, consumo de fibrinogênio e

inibição da agregação plaquetária, levando a manifestações clínicas características (KAMIGUTI; CARDOSO, 1989; ZELANIS et al., 2007).

O termo hemostasia significa prevenção da perda de sangue e envolve não somente a formação do coágulo sanguíneo, mas também sua dissolução (BRAUD et al., 2000a). Toda vez que um vaso sanguíneo sofre lesão ou ruptura, diversos mecanismos entram em ação para interromper a perda de sangue pelo organismo. Instantaneamente, ocorre uma vasoconstrição para reduzir o fluxo de sangue na área atingida, seguida de alterações na superfície endotelial vascular e liberação local de fatores pró-coagulantes. As alterações vasculares permitem a adesão de plaquetas, iniciando a ativação plaquetária que culminará em agregação e na formação de um tampão plaquetário. A seguir, diversas reações são desencadeadas e a formação do coágulo ao final da cascata resulta da ativação do fibrinogênio pela trombina, levando à formação de uma rede de fibrina ao redor do tampão plaquetário, fortalecendo-o e transformando-o em um coágulo rígido insolúvel (DAVIE et al., 1991; BRAUD et al., 2000a).

A cascata de coagulação sanguínea (**Fig. 1**) é convencionalmente considerada como uma série de passos sequenciais de ativação de zimogênios, em que cada fator é substrato da enzima anterior e o ativador da proenzima subsequente (BOON, 1993). A formação de trombina a partir de protrombina é uma etapa crítica da coagulação, pois esta enzima não somente inicia a conversão de fibrinogênio à fibrina, como também ativa plaquetas e outros fatores da cascata, como V, VIII e XIII (e possivelmente os fatores VII e XI), além de estimular a fibrinólise e estar relacionada com a ativação da proteína C para inibir a coagulação sanguínea (BRAUD et al., 2000a; MATSUI et al., 2000).

Após a formação do coágulo e interrupção do sangramento, o endotélio vascular é restaurado por uma série de divisões celulares. O sistema fibrinolítico (**Fig. 1**) é então ativado pela formação de plasmina, que é uma serinoprotease gerada a partir do plasminogênio pela ação de ativadores de plasminogênio. Este processo é iniciado com a incorporação de plasminogênio ao coágulo de fibrina, seguida de liberação de ativadores de plasminogênio do endotélio vascular em resposta a altas concentrações de trombina. Uma vez formada, a plasmina degrada a rede de fibrina e dissolve gradualmente o coágulo (BOON, 1993; BRAUD et al., 2000a).

Figura 1. Diagrama esquemático da cascata de coagulação sanguínea e do sistema fibrinolítico (Adaptado de DAVIE et al., 1991 e BOON, 1993). A iniciação da coagulação pode ocorrer por um sistema de ativação por contato a superfícies celulares carregadas negativamente (*via intrínseca*) ou por lesão vascular com exposição de fatores teciduais, chamados de tromboplastina (*via extrínseca*). As duas vias convergem pela formação do fator Xa, resultando na formação de um coágulo de fibrina estável. O sistema fibrinolítico é responsável pela degradação dos coágulos ao final do processo de hemostasia, exercendo assim um importante papel na manutenção do sistema vascular sanguíneo. Os fatores de coagulação ativados são designados pela letra “a” minúscula e os fosfolípidios citados indicam que as reações em questão ocorrem em membranas de vasos ou plaquetas. tPA e uPA são abreviações para os ativadores de plasminogênio tipo tecidual e uroquinase, respectivamente.

Peçonhas de serpentes contêm uma variedade de proteínas que afetam a hemostasia, sendo algumas capazes de interagir com fatores da cascata de coagulação, enquanto outras podem agir sobre plaquetas e outros componentes do sistema hemostático. Várias destas proteínas são enzimas, como nucleotidases, fosfolipases A_2 , metaloproteases e serinoproteases, enquanto outras, como desintegrinas e lectinas tipo C, não apresentam atividade enzimática (MARKLAND, 1998; BRAUD et al., 2000a; WHITE, 2005).

Em alguns casos, o efeito das enzimas de peçonhas de serpentes na hemostasia é claro. As nucleotidases, por exemplo, que hidrolisam ADP para produzir adenosina, são potentes inibidores da agregação plaquetária (OUYANG; HUANG, 1983). Algumas fosfolipases A_2 de peçonhas de serpente atuam como anticoagulantes hidrolisando os fosfolipídios negativamente carregados que servem de cofatores para os complexos “tenase” e “protrombinase” (que formam o fator Xa e trombina, respectivamente), ou hidrolisando fosfolipídios da membrana de plaquetas e induzindo agregação pela liberação de ácido araquidônico e/ou de fatores ativadores de plaquetas (PAF) (BOFFA; BOFFA, 1976; KINI; EVANS, 1989). Já as desintegrinas inibem a agregação plaquetária competindo especificamente com integrinas endógenas (NIEWIAROWSKI et al., 1994), enquanto que as lectinas tipo C ligam-se seletivamente a proteínas de membrana das plaquetas ou a fatores da cascata de coagulação (KINI; EVANS, 1990).

Muitas metaloproteases e serinoproteases de peçonhas de serpentes afetam a hemostasia, várias delas degradando fatores da coagulação ou proteínas de células endoteliais, e outras agindo seletivamente como as enzimas fisiológicas, ativando fatores específicos da cascata de coagulação ou da fibrinólise (BRAUD et al., 2000a). Deste ponto em diante, as serinoproteases de peçonhas de serpentes serão abordadas mais especificamente, já que o foco de estudo do presente trabalho encontra-se nesta classe de enzimas.

1.4. Serinoproteases de peçonhas de serpentes

As serinoproteases apresentam diversas funções e podem estar envolvidas na digestão, ativação do sistema complemento, diferenciação celular e hemostasia, sendo encontradas em microrganismos, plantas e diversos animais (BRAUD et al.,

2000a). Estas enzimas têm como propriedade estrutural uma tríade catalítica altamente conservada responsável pelo mecanismo catalítico comum, com um resíduo de serina altamente reativo formando um complexo transitório acil-enzima estabilizado pela presença dos resíduos de histidina e ácido aspártico no sítio ativo (BARRETT; RAWLINGS, 1995; SERRANO; MAROUN, 2005).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) afetam a hemostasia agindo sobre diversos passos da cascata de coagulação, muitas vezes não especificamente por meio de degradação proteolítica, mas seletivamente por ativação ou inativação de fatores de coagulação envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise. Isoladamente, não são consideradas letais, mas contribuem para o efeito tóxico quando associadas com outras proteínas da peçonha (BRAUD et al., 2000a).

Assim como as serinoproteases humanas, as SVSPs pertencem à subfamília de proteases tripsina-símile, apresentando especificidade de clivagem após resíduos de arginina ou lisina e sendo compostas por aproximadamente 235 aminoácidos, incluindo 12 resíduos de cisteína conservados e pareados em seis pontes dissulfeto (BRAUD et al., 2000a; SERRANO; MAROUN, 2005). São enzimas sensíveis a reagentes que modificam a serina do sítio ativo, como o PMSF (fenil metil sulfonyl fluoreto) e DFP (diisopropil fluorofosfato), e a maioria delas são glicoproteínas com números variados de sítios de N- ou O-glicosilações em posições não homólogas de suas sequências de aminoácidos, sendo este grau de glicosilação responsável pela grande diferença entre as massas moleculares destas enzimas (MATSUI et al., 2000; SERRANO; MAROUN, 2005). A flavoxobin de *Trimeresurus flavoviridis*, por exemplo, apresenta massa molecular próxima de 25 kDa pois não apresenta sítios de glicosilação (SHIEH et al., 1985; 1988), enquanto que 62% da alta massa molecular de 67 kDa da *Bothrops* protease A de *Bothrops jararaca* correspondem a sítios de N- e O-glicosilação (MURAYAMA et al., 2003).

A comparação das sequências de aminoácidos de SVSPs com aquelas de serinoproteases clássicas, como a quimotripsina, tripsina, trombina e calicreína, mostra diferentes níveis de similaridade, geralmente abaixo de 40%, com várias substituições entre as sequências e tendo o sítio catalítico como a principal região conservada. Apesar destas diferenças estruturais significativas, as SVSPs podem apresentar atividades funcionais similares às das serinoproteases clássicas,

podendo então ser classificadas como calicreína-símile, que têm ação hipotensora liberando bradicinina a partir do cininogênio plasmático, ou trombina-símile, responsáveis pela formação do coágulo de fibrina ao final da cascata de coagulação sanguínea (MATSUI et al., 2000; CASTRO et al., 2004). Existem também algumas SVSPs que apresentam atividades distintas, ativando fator V (TOKUNAGA et al., 1988), proteína C (KISIEL et al., 1987), plasminogênio (ZHANG et al., 1995) ou plaquetas (SERRANO et al., 1995).

Algumas SVSPs apresentam tanto atividade fibrinogenolítica quanto fibrinolítica, mas a maioria delas é capaz apenas de clivar o fibrinogênio, liberando fibrinopeptídeo A, fibrinopeptídeo B ou ambos. De acordo com isso, as enzimas trombina-símile de peçonhas de serpentes (SVTLEs) podem ser classificadas em três categorias: (i) SVTLE-AB: enzimas que, como a trombina, convertem o fibrinogênio em fibrina pela hidrólise das cadeias A α e B β , liberando os fibrinopeptídeos A e B; (ii) SVTLE-A, que clivam somente a cadeia A α do fibrinogênio; (iii) SVTLE-B, que clivam somente a cadeia B β do fibrinogênio (CASTRO et al., 2004; SERRANO; MAROUN, 2005).

Apesar de possuírem ação sobre o fibrinogênio, nenhuma das SVTLEs já estudadas apresentou todas as multifunções da trombina, embora algumas delas também ativem o fator VIII e/ou XIII ou promovam agregação plaquetária (NISHIDA et al., 1994; MARRAKCHI et al., 1997; MATSUI et al., 2000). Além disso, por clivarem preferencialmente apenas a cadeia A α ou a cadeia B β do fibrinogênio e não serem capazes de ativar o fator XIII, as SVTLEs produzem coágulos de fibrina anormais compostos de pequenos polímeros que se dispersam rapidamente e não são interligados pelo fator XIII ativado, resultando na inibição da formação de coágulos sanguíneos normais na vítima (BRAUD et al., 2000a; MATSUI et al., 2000).

Grande parte das serinoproteases já estudadas pertence a peçonhas de serpentes dos gêneros *Agkistrodon* (OUYANG et al., 1971; NOLAN et al., 1976; HAHN et al., 1996; CHO et al., 2001; KOH et al., 2001), *Trimeresurus* (OYAMA; TAKAHASGU, 2000; 2003), *Crotalus* (MARKLAND JR, 1976; RAW et al., 1986; ALEXANDER et al., 1988) e *Bothrops* (**Tabela 1**). Como mostrado na tabela 1, diversas serinoproteases já foram isoladas e caracterizadas a partir de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, porém, até o presente trabalho, esta classe de proteases ainda não havia sido explorada para a espécie *Bothrops pirajai*.

Tabela 1. Serinoproteases isoladas de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*.

Espécie de <i>Bothrops</i>	Nome da serinoprotease	Massa molecular	Presença de Glicosilação	pI	Atividade Coagulante/ Fibrinogenolítica	Referências
<i>B. alternatus</i>	Balterobin	36 kDa	---	---	Sim	Smolka et al., 1998
	Bhalternin	31,5 kDa	---	---	Sim (A α)	Costa et al., 2010
<i>B. andianus</i>	TLBan	29 kDa	Sim	---	Sim (A α e B β)	Valeriano-Zapana et al., 2012
<i>B. asper</i>	SP	32 kDa	---	---	Sim	Pérez et al., 2008
<i>B. atrox</i>	Batroxobin	41,5 kDa	Sim (10,2%)	6,6	Sim (A α)	Stocker; Barlow, 1976
	Thrombocytin	36 kDa	Sim (5,6%)	---	Sim (A α)	Kirby et al., 1979; Niewiarowski et al., 1979
	TLE1 e TLE2	38 kDa	---	---	Sim	Petretski et al., 2000
	Ba III-4	33 kDa	---	5,06	Sim	Ponce-Soto et al., 2007
<i>B. colombiensis</i>	Coagulant Proteinase	67 kDa	Sim	4,7-5,2	Sim	Gabrijelcic et al., 1982
<i>B. insularis</i>	I-SII-R	45 kDa	Sim (22%)	---	Sim (A α e B β)	Selistre; Giglio, 1987
<i>B. jararaca</i>	<i>Bothrops</i> Protease A (BPA)	67 kDa	Sim (62%)	3,55	Não é coagulante, mas age sobre o fibrinogênio (A α e B β)	Reichl et al., 1983; Murayama et al., 2003; Paes-Leme et al., 2008
	Bothrombin	35 kDa	Sim	5,54	Sim (A α)	Nishida et al., 1994
	PA-BJ	30 kDa	Sim	>9,0	Não	Serrano et al., 1995
	KN-BJ1 e KN-BJ2	38 e 39 kDa	Sim	4,3-4,7	Sim (A α)	Serrano et al., 1998
	TL-BJ1, TL-BJ2 e TL-BJ3	30, 31 e 32 kDa	Sim	3,9-4,1	Sim (A α)	Serrano et al., 2000
	Jararassin-I	30 kDa	---	7,4-7,8	Sim (B β)	Vieira et al., 2004
<i>B. jararacussu</i>	FC-Bj	50,6 kDa	Sim (19%)	3,3-4,4	Sim (A α e B β)	Zaganelli et al., 1996
	D-V	37,5 kDa	Sim (5,3%)	5,2	Sim (A α)	Andrião-Escarso et al., 1997
	Jararacussin-I	28 kDa	Sim (5,4%)	5,0	Sim (A α e B β)	Bortoleto et al., 2002
	BJ-48	52 kDa	Sim (42%)	---	Sim (B β)	Silva-Junior et al., 2007
	BjussuSP-I	61 kDa	Sim	3,8	Sim (A α)	Sant'Ana et al., 2008a
<i>B. lanceolatus</i>	F-II-1a	38,1 kDa	---	---	Sim (A α e B β)	Lôbo de Araújo et al., 1998
<i>B. leucurus</i>	Leucurobin (leuc)	35 kDa	Sim	---	Sim (A α)	Magalhães et al., 2007
<i>B. marajoensis</i>	TLBm	33,3 kDa	---	6,47	Sim (A α e B β)	Vilca-Quispe et al., 2010
<i>B. moojeni</i>	Batroxobin	36 kDa	Sim (5,8%)	---	Sim (A α)	Stocker et al., 1982
	MSP1 e MSP2	34 e 38 kDa	Sim	---	Baixa atividade coagulante	Serrano et al., 1993
	MOO3	27 kDa	Não	7,8	Sim (A α e B β)	Oliveira et al., 1999
<i>B. pauloensis</i>	BpSP-I	34 kDa	Sim	6,4	Sim (A α e B β)	Costa et al., 2009

1.5. *Bothrops pirajai*

A espécie de serpente *Bothrops pirajai* (**Fig. 2**) foi inicialmente descrita por Amaral (1923), sendo endêmica da região Sudeste do estado da Bahia, Nordeste do Brasil, onde é conhecida popularmente como “jararacuçu da Bahia” ou “jararacuçu-tapete” (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008).

Figura 2. Foto da espécie *Bothrops pirajai* (fonte: www.arkive.org), conhecida popularmente como “jararacuçu da Bahia” ou “jararacuçu-tapete”.

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

Os primeiros estudos envolvendo a peçonha de *B. pirajai* são referentes ao isolamento e caracterização de fosfolipases A_2 , incluindo duas miotoxinas, enzimas Lys49 PLA_2 , denominadas piratoxins-I e II (MANCUSO et al., 1995; TOYAMA et al., 1995) e uma Asp49 PLA_2 denominada piratoxin-III (TOYAMA et al., 1999). Os estudos seguintes trouxeram dados funcionais adicionais, além da elucidação estrutural e cristalografia destas enzimas (CANDURI et al., 1998; DE AZEVEDO et al., 1998; LEE et al., 1998; TOYAMA et al., 1998; LANDUCCI et al., 2000; TOYAMA et al., 2000; SOARES et al., 2001). Recentemente, uma fosfolipase A_2 ácida, chamada de Bpir-I- PLA_2 , foi isolada da mesma peçonha e mostrou atuar em vários pontos da hemostasia, sendo capaz de inibir a agregação plaquetária e retardar o

tempo de coagulação do plasma, além de induzir efeito hipotensor (TEIXEIRA et al., 2011).

Além das fosfolipases A₂, também já foram isoladas da peçonha de *B. pirajai* uma lectina tipo-C denominada BPL (HAVT et al., 2005) e uma L-aminoácido oxidase (BpirLAO-I) com atividade antibacteriana, antiparasitária e antitumoral (IZIDORO et al., 2006). Com a conclusão do presente trabalho sobre serinoproteases e do trabalho em desenvolvimento pelo nosso grupo de pesquisa sobre uma metaloprotease da classe P-I, algumas das principais classes de proteínas de peçonhas de serpentes da família Viperidae já terão sido estudadas a partir da peçonha de *B. pirajai*.

1.6. Aplicações e potencial terapêutico de serinoproteases

O interesse médico-científico nas enzimas trombina-símile tem crescido consideravelmente devido às diferenças específicas quando comparadas à própria trombina, que é uma enzima multifuncional (MARSH; WILLIAMS, 2005). Estas serinoproteases são promissoras na clínica médica como agentes defibrinogénantes, podendo ser utilizadas em pacientes vítimas de trombose, infarto do miocárdio, doenças vasculares periféricas e isquemia aguda (BELL, 1988; STOCKER; MEIER, 1988).

A enzima ancrod (Viprinex®) da peçonha de *Agkistrodon rhodostoma*, por exemplo, mostrou-se efetiva em testes contra acidentes vasculares cerebrais isquêmicos agudos (SAMSA et al., 2002) e é atualmente testada como inibidora de fibrinogênio para esta indicação (KOH et al., 2006). Ancrod é uma serinoprotease trombina-símile que cliva a cadeia A α do fibrinogênio formando fibrina, mas diferentemente da trombina, não é suscetível à inibição por inibidores plasmáticos como a antitrombina. Esta enzima também ativa o sistema fibrinolítico, formando plasmina e levando à eventual depleção de plasminogênio. Seu efeito defibrinogénante também reduz a viscosidade do sangue, melhorando assim as características de fluxo sanguíneo (GARDINER; ANDREWS, 2008).

Da mesma forma, a batroxobin (Defibrase®) da peçonha de *B. atrox* ou *B. moojeni* é uma enzima trombina-símile que cliva a cadeia A α do fibrinogênio formando fibrina, e sendo assim tem diversas aplicações como ferramenta em

pesquisas de coagulação sanguínea e diagnóstico, devido à sua ação específica sobre o fibrinogênio e sua capacidade de coagular o plasma rico em plaquetas sem afetar a integridade e as funções das plaquetas, além de ser insensível a inibidores de trombina, como heparina e hirudina (KOH et al., 2006).

Tanto a enzima ancrod como a batroxobin têm sido utilizadas em ensaios clínicos para examinar os efeitos de agentes defibrinogenantes em diversas condições clínicas, e embora os tratamentos tenham sido bem tolerados pelos pacientes, os resultados dos testes ainda não são conclusivos. Contudo, ambas têm sido consideradas para uso em combinação com agentes trombolíticos em indivíduos com doenças arteriais (GARDINER; ANDREWS, 2008).

Algumas enzimas trombina-símile de peçonhas de serpentes, como a própria batroxobin, também vêm sendo utilizadas no preparo de selantes de fibrina, produtos usados como adesivos cirúrgicos de grande eficácia em circunstâncias médicas que envolvem traumas teciduais ou cirurgias (DASCOMBE et al., 1997). Uma das enzimas mais utilizadas até então para este propósito é a gyroxin da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, inicialmente descrita por Barrio (1961) e purificada por Alexander e colaboradores (1988). Os selantes de fibrina compostos de enzimas trombina-símile de peçonhas de serpentes e de fibrinogênio extraído de animais de grande porte já foram testados tanto em animais quanto em humanos, e possuem diversas vantagens, como o processo de produção rápido, fácil e barato, a diversidade de aplicações possíveis, a ausência de reações adversas notáveis, o fato de não usarem sangue humano ou apresentarem risco de transmissão de doenças infecciosas, entre outras (BARROS et al., 2009). A aplicação de selantes que utilizam gyroxin em cirurgias periodontais foi avaliada por Barbosa e colaboradores (2007; 2008), sugerindo o possível uso destes adesivos como alternativas às suturas usualmente utilizadas nestas cirurgias.

Outra possível aplicação para as serinoproteases foi investigada por Warner e colaboradores (2007; 2009), que mostraram que uma protease similar ao fator Xa, isolada de *Pseudonaja textilis textilis*, age com ampla potência reduzindo a perda de sangue e o tempo de coagulação em modelos de trauma de fígado, rins, baço e pele em ratos, sendo a próxima etapa do trabalho referente ao teste dessa eficácia também em modelos humanos.

Além destes potenciais já conhecidos e estudados, existem também outros alvos fisiológicos em que as serinoproteases de peçonhas de serpentes poderiam agir, como por exemplo, o sistema complemento e o processo inflamatório, porém, até hoje, poucos estudos avaliaram estes possíveis potenciais.

1.7. O sistema complemento e peçonhas de serpentes

O sistema complemento humano é composto por mais de 30 proteínas plasmáticas e de superfície celular que participam de diversos processos biológicos importantes, que vão desde a ativação do processo inflamatório em resposta à geração de fragmentos proteolíticos de seus componentes, à promoção de fagocitose e lise de patógenos e células próprias alteradas por meio de processos de opsonização e formação de complexos de ataque à membrana (MAC). As proteínas do sistema complemento são componentes essenciais da imunidade humoral, agindo tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa por um sistema de reações em cascata que levam a estes efeitos fisiológicos (WALPORT, 2001a; 2001b; WAGNER; FRANK, 2010).

Dependendo do estímulo, a ativação do sistema complemento pode ocorrer por três vias distintas: as vias clássica (VC), alternativa (VA) ou das lectinas (VL) (**Fig. 3**). A via clássica (VC) é normalmente desencadeada pela interação de um antígeno e um anticorpo específico (IgM ou IgG), formando um imunocomplexo que é reconhecido pelo componente C1 e culmina na formação de um complexo de ataque à membrana (MAC) formado pelos componentes C5b, C6, C7, C8 e vários C9. Este processo gera poros na bicamada lipídica das membranas celulares, podendo levar à morte de alvos celulares e microrganismos pelo rompimento de suas membranas. Diferentemente da VC, a via alternativa (VA) não depende do reconhecimento de patógenos por anticorpos e é iniciada por hidrólise espontânea do componente circulante C3. A ligação de proteínas específicas da VA, como os fatores B e D, ao C3 hidrolisado ou ao fragmento C3b levam à ativação adicional de C3, formando mais fragmentos C3b que irão interagir com polissacarídeos e proteínas de superfície de células alteradas ou microrganismos para gerar MAC, assim como ocorre na VC. A via das lectinas (VL) é ativada pela ligação de uma lectina tipo-C ligante de manose (MBL, *mannose-binding lectin*) a glicoproteínas ou

polissacarídeos encontrados na superfície de microrganismos. A ligação de MBL a serinoproteases circulantes associadas (MASP) forma um complexo que leva à clivagem dos componentes C4 e C2, resultando na geração de uma C3 convertase similar à da VC (WAGNER; FRANK, 2010).

Como todas as vias de ativação do complemento se unem com a deposição de C3b no alvo e este fragmento é um fator iniciante da VA, a ativação do complemento pode ser iniciada pelas VC ou VL e amplificada pela VA. Além disso, estes processos de ativação não devem ser considerados isoladamente, já que *in vivo* é provável que mais de uma ou mesmo todas as três vias ocorram simultaneamente. Além da formação do MAC, a ativação do complemento tem como resultado importante a geração de potentes mediadores pró-inflamatórios, como os fragmentos C3a e C5a, denominados anafilatoxinas (WAGNER; FRANK, 2010), que estão relacionados a diversos efeitos fisiológicos como contração da musculatura lisa, quimiotaxia e ativação de leucócitos, aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, intensificação da fagocitose e da liberação de grânulos enzimáticos pelos neutrófilos, entre outros (HAAS; STRIJP, 2007).

Embora a ação defensora do complemento tenha microrganismos e células anormais como alvos, sua ativação pode causar danos também a células normais do hospedeiro devido à geração de anafilatoxinas e quimiotaxinas, e à formação do MAC. Assim, os mecanismos de regulação do complemento são extremamente importantes para manter um equilíbrio homeostático, sendo controlados por vários inibidores como reguladores ligados a membranas celulares (CR1, MCP, DAF e CD59) e proteínas plasmáticas (C1-INH ou serping1) (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010; WAGNER; FRANK, 2010).

Figura 3. Vias de ativação do sistema complemento (Adaptado de WAGNER; FRANK, 2010). Na via clássica (VC), o complexo antígeno-anticorpo é reconhecido pelo componente C1q, levando à ativação do fator C1 que então cliva C4 e C2, resultando na formação de C4b2a (*C3 convertase*). A via das lectinas (VL) é ativada pela interação direta de lectinas ligantes de manose (MBL) com carboidratos de glicoproteínas microbianas ou celulares. Serinoproteases associadas à MBL (MASPs) desencadeiam a clivagem de C4 e C2, resultando na formação de C4b2a (*C3 convertase*), como na VC. Na via alternativa (VA), o fator C3 circulante sofre hidrólise espontânea, interagindo com os fatores B e D para formar a C3 convertase da fase de iniciação (C3(H₂O)Bb). O C3b formado a partir desta convertase se liga à superfície-alvo e reage com os fatores B e D formando a C3 convertase da fase de amplificação (C3b2BbP), que é estabilizada pela proteína properdina (P). As três vias convergem com a formação das C5 convertases pela deposição adicional de C3b nas C3 convertases. A clivagem do fator C5 gera o fragmento C5b, que, quando ligado à superfície-alvo, desencadeia a ligação seriada dos fatores C6, C7, C8 e vários C9 para a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). Os fragmentos C3a, C4a e C5a liberados pela ativação dos respectivos fatores apresentam importantes propriedades pró-inflamatórias e são chamados anafilatoxinas.

Várias peçonhas de serpentes possuem atividade sobre o sistema complemento. Eggertsen e colaboradores (1980) mostraram que 22 das 26 peçonhas de serpentes avaliadas no estudo foram capazes de inibir a atividade do complemento em soro humano normal, com consumo dos fatores C2, C3 e C4, e os efeitos mais pronunciados foram apresentados pelas peçonhas de *Naja naja*, *Agkistrodon rhodostoma*, *A. halys*, *Vipera lebetina* e *Trimeresurus okinawensis*. Em um estudo mais recente, Tanaka e colaboradores (2012) avaliaram a ação de peçonhas de sete espécies de serpentes do gênero *Micrurus* sobre o sistema complemento, mostrando que estas ativaram a VC e/ou VL sem agir sobre a VA. Além disso, uma quantidade significativa das anafilatoxinas C3a, C4a e C5a foi gerada no soro tratado com estas peçonhas em decorrência da ativação do complemento (TANAKA et al., 2012). Já Pidde-Queiroz e colaboradores (2010) investigaram a ação de peçonhas de 19 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* sobre o complemento, mostrando que todas foram capazes de ativar a VC, enquanto apenas 11 inibiram completamente a VA e 16 reduziram a atividade da VL. As peçonhas de *B. jararacussu* e *B. alternatus* mostraram menor atividade sobre a VC, sendo ainda incapazes de inibir a VA e VL, enquanto que a peçonha de *B. pirajai* apresentou 100% de inibição sobre a VC, aproximadamente 75% sobre a VA e 50% sobre a VL (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010). Ayres (2010) também avaliou os efeitos das peçonhas de *B. pirajai* e *B. jararacussu* sobre a atividade hemolítica das VC/VL e VA do complemento humano, observando maiores inibições sobre as VC/VL do que sobre a VA. O mesmo estudo evidenciou ainda que estas peçonhas foram capazes de promover migração de neutrófilos devido à liberação dos fatores quimiotáticos C3a e C5a (AYRES, 2010).

Algumas proteínas de peçonhas de serpentes com ação anticomplemento já foram isoladas e caracterizadas, sendo o CVF (*cobra venom factor*) o mais amplamente estudado até o momento (VOGEL; FRITZINGER, 2010). Esta glicoproteína de três cadeias, isolada da peçonha de *Naja naja kaouthia*, apresenta massa molecular de 149 kDa e 49% de identidade sequencial ao fator C3, com pronunciada similaridade funcional ao fator C3b. Assim como este fator, o CVF se liga ao fator B do soro de humanos e outros mamíferos para formar o complexo CVF,B, que é clivado pelo fator D a CVF,Bb, uma C3/C5 convertase análoga à convertase formada fisiologicamente com C3b (FRITZINGER et al., 1994). Além do

CVF, também já foram isolados da peçonha de cobra o fator de alta massa molecular H-CoF (BALLOW; COCHRANE, 1969) e o inibidor CI (VON ZABERN et al., 1981), além de uma protease de *Naja naja siamensis* (O'KEEFE et al., 1988). Outros estudos mostram o isolamento de proteínas anticomplemento de peçonhas do gênero *Crotalus*, como as quatro proteases da peçonha de *Crotalus atrox* (MAN; MINTA, 1977), duas proteases hemorrágicas (B1 e B2) de *Crotalus basiliscus basiliscus* (MOLINA et al., 1990) e a protease fibrinolítica M5 de *Crotalus molossus molossus* (CHEN; RAEL, 1997). Uma protease da peçonha de *Vipera lebetina* também mostrou ser capaz de inibir o sistema complemento humano, agindo sobre a VC e VA como determinado por ensaios hemolíticos (GASMI et al., 1994).

A maioria das proteases descritas com ação anticomplemento pertence à classe das metaloproteases, como a oxiagin da peçonha de *Naja oxiana*, que inibiu a VC, mas não a VA, pela inibição da formação de C3 convertase (SHOIBONOV et al., 2005) e a atrase B da peçonha de *Naja atra*, que cliva os fatores B, C6, C7 e C8, inibindo a atividade hemolítica do complemento (SUN; BAO, 2010). Do gênero *Bothrops*, Farsky e colaboradores (2000) investigaram a ação de duas fosfolipases A₂ miotóxicas e uma metaloprotease (BaP1) da peçonha de *B. asper*, mostrando que apenas esta última foi capaz de ativar o sistema complemento, como mostrado pela diminuição da atividade hemolítica do soro na presença da metaloprotease. Em relação às serinoproteases de peçonhas de serpentes que agem sobre o sistema complemento, o único estudo publicado é o de Yamamoto e colaboradores (2002), que mostraram que a flavoxobin de *Trimeresurus flavoviridis* foi capaz de clivar o fator C3 humano de forma específica, agindo como uma enzima C3 convertase e iniciando a cascata do complemento.

1.8. O processo inflamatório e peçonhas de serpentes

A resposta inflamatória é um processo adaptativo em que o organismo responde às lesões teciduais ou infecções locais com o intuito de reestabelecer a homeostase, possibilitando a cura e a reconstituição dos tecidos danificados (TEIXEIRA et al., 2009). Esta resposta engloba uma sequência de eventos que podem ser divididos em vasculares e celulares. Os eventos vasculares compreendem a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular com

consequente extravasamento plasmático, promovendo o aumento da concentração local de mediadores como os componentes do sistema complemento, da coagulação, do sistema fibrinolítico e de cininas. Simultaneamente são desencadeados os efeitos celulares, com ativação de células fagocitárias residentes nos tecidos. Sendo assim, a inflamação é iniciada e conduzida por mediadores de origem celular e plasmática que promovem os sinais característicos desta resposta: dor, calor, rubor e edema, que podem vir acompanhados ou não de perda de função do tecido ou órgão afetado (ROCHA E SILVA, 1978).

A resposta inflamatória aguda ocasiona alterações funcionais da microvasculatura, levando à migração de componentes do sangue como plasma e leucócitos para o local da lesão, seguido de fagocitose por células competentes e dor local (TEIXEIRA et al., 2009). As alterações no fluxo e calibre vascular começam logo após a lesão, com a vasodilatação e o aumento da permeabilidade da microvasculatura levando ao extravasamento de plasma rico em células e proteínas sanguíneas, o que resulta em edema e dor. Vários mediadores inflamatórios, que incluem quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas e eicosanóides, são produzidos por células endoteliais e residentes, principalmente mastócitos, macrófagos e células dendríticas. Em paralelo, leucócitos circulantes (inicialmente neutrófilos) migram para o local da lesão sob a influência de agentes quimiotáticos e, em seguida, ocorre a fagocitose de agentes infecciosos e liberação de produtos microbicidas, como espécies reativas de oxigênio (RABINOVITCH; DE STEFANO, 1973; TEIXEIRA et al., 2009). A resolução da inflamação e a fase de reparo envolvem a diminuição dos componentes pró-inflamatórios e a liberação de mediadores químicos anti-inflamatórios principalmente por macrófagos residentes e recrutados, com subsequente remoção de fluido e detritos celulares pelo sistema linfático (SERHAN; SAVILL, 2005). Caso a resposta aguda não seja capaz de neutralizar o estímulo nocivo, o processo inflamatório persiste e adquire novas características típicas de uma inflamação crônica, como a formação de granulomas e presença de fagócitos mononucleares, células linfoides e fibroblastos na área inflamada (MEDZHITOV, 2008; TEIXEIRA et al., 2009).

A migração de leucócitos para os tecidos é essencial à resposta inflamatória e ocorre em várias etapas, sendo mediada por três classes principais de moléculas de adesão (integrinas, selectinas e imunoglobulinas), expressas tanto pelos leucócitos

quanto pelas células endoteliais. A expressão destas moléculas de adesão é regulada por uma variedade de mediadores liberados durante o processo inflamatório (FERNANDES et al., 2006). Além deste recrutamento celular e da formação de edema, a inflamação também é frequentemente associada com dor e hiperalgesia.

O fenômeno da dor é originado em fibras nervosas sensoriais periféricas pela ativação de nociceptores que transmitem informações sobre estímulos nocivos da periferia para o sistema nervoso central. As vias periféricas da dor são ativadas por uma série de estímulos, que incluem mediadores inflamatórios envolvidos na geração, persistência e intensidade da dor. O reconhecimento inicial da lesão leva à produção e/ou liberação de mediadores como a bradicinina, histamina, serotonina, óxido nítrico, prostanóides, citocinas e outros mediadores que podem induzir dor de duas maneiras diferentes: i) pela ativação direta de nociceptores (como promovido pelas citocinas), e/ou ii) pela ação sobre canais iônicos, induzindo hiperalgesia, ou seja, sensibilizando fibras sensoriais para outros mediadores e estímulos, reduzindo os seus limiares de modo que estas fibras agora respondem a estímulos de intensidades inferiores (como promovido pelas prostaglandinas, em especial pela PGE₂) (HADDAD, 2007; RITTNER et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009).

Como já mencionado anteriormente, o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado pelo acentuado dano tecidual local, com hemorragia, mionecrose, formação de bolhas e inflamação proeminente. Esta resposta inflamatória está intimamente relacionada ao progresso da lesão tecidual, gerando edema e induzindo a dor, a infiltração de leucócitos e a liberação de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MOURA-DA-SILVA et al., 2007; LOPES et al., 2009). Diversos mediadores já foram relacionados à inflamação promovida por peçonhas de serpentes, incluindo serotonina, histamina, fatores derivados do sistema complemento, citocinas e metabólitos de ciclooxygenases e lipooxygenases (TREBIEN; CALIXTO, 1989; CHAVES et al., 1995; FARSKY et al., 1997; ZAMUNER et al., 2001; ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002; OLIVO et al., 2007).

O edema local é uma das principais características do envenenamento botrópico, sendo resultado da síntese e/ou liberação de potentes mediadores pró-inflamatórios, como eicosanóides, que causam extravasamento plasmático e

vasodilatação. Estes efeitos podem ser desencadeados por diferentes componentes da peçonha, bem como por danos na microvasculatura (GUTIÉRREZ et al., 1984; TREBIEN; CALIXTO, 1989; CHAVES et al., 1995; GALVÃO NASCIMENTO et al., 2010). De fato, a reação inflamatória local induzida por peçonhas botrópicas parece não estar relacionada a uma classe específica de toxinas, e sim à ação sinérgica de várias toxinas, como fosfolipases A_2 e metaloproteases (TEIXEIRA et al., 2003; 2005; MOURA-DA-SILVA et al., 2007).

As fosfolipases A_2 de peçonhas de serpentes são capazes de desencadear uma série de eventos inflamatórios, caracterizados pelo aumento da permeabilidade microvascular e formação de edema, o recrutamento de leucócitos em tecidos, nocicepção e liberação de mediadores inflamatórios (TEIXEIRA et al., 2003). Uma vez que as PLA_2 s cataliticamente inativas (Lys49 PLA_2 s) induzem efeitos inflamatórios e nociceptivos semelhantes às enzimas cataliticamente ativas (Asp49 PLA_2 s), é evidente que a atividade catalítica não é estritamente necessária para desencadear estas respostas inflamatórias, embora possa contribuir para estes efeitos (TEIXEIRA et al., 2003; ZULIANI et al., 2005).

As metaloproteases de peçonhas de serpentes pertencem à outra classe de enzimas bastante estudadas quanto aos seus efeitos pró-inflamatórios (TEIXEIRA et al., 2005). A primeira evidência experimental de que metaloproteases causariam inflamação foi fornecida por Gutiérrez e colaboradores (1995b), que mostraram que uma enzima da classe P-I isolada da peçonha de *B. asper* (BaP1) induzia edema de pata em camundongos. Após injeção intramuscular, a BaP1 levou à formação de bolhas e à infiltração de leucócitos na derme, efeitos estes associados com a desgranulação de mastócitos e macrófagos (RUCAVADO et al., 1998; 1999). Esta enzima também induziu a quimiotaxia de neutrófilos em ratos, provavelmente mediada por componentes derivados do sistema complemento, como o fragmento C5a (FARSKY et al., 2000). Além disso, a BaP1 mostrou ser capaz de liberar interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6) em tecido muscular, sugerindo que as citocinas devem mediar os eventos inflamatórios locais induzidos por esta metaloprotease (RUCAVADO et al., 2002). Similarmente, Lopes e colaboradores (2009) mostraram que a metaloprotease da classe P-I isolada da peçonha de *B. neuwiedi* (neuwiedase) promoveu a liberação de IL-1 e IL-6 após a injeção da toxina no músculo gastrocnêmio de camundongos. Estudos mostraram também que a BaP1

causa hipernocicepção mediada pela liberação local de PGE_2 e $TNF-\alpha$ (fator de necrose tumoral α) (FERNANDES et al., 2007).

Zychar e colaboradores (2010) avaliaram a participação de metaloproteases, serinoproteases e fosfolipases A_2 na resposta inflamatória induzida pela peçonha de *B. jararaca* em camundongos, demonstrando que as metaloproteases são os principais componentes que contribuem para os efeitos inflamatórios locais e nociceptivos induzidos por esta peçonha, enquanto que as fosfolipases A_2 apresentaram um efeito menor, limitado a nocicepção, e as serinoproteases não contribuíram significativamente para as reações inflamatórias avaliadas, estando provavelmente relacionadas apenas aos distúrbios de pressão arterial em função da produção sistêmica de bradicinina.

Embora a maioria dos estudos disponíveis indique um papel predominante por parte das fosfolipases A_2 e metaloproteases nos efeitos pró-inflamatórios e nociceptivos promovidos por peçonhas de serpente, o papel de serinoproteases e outros componentes da peçonha sobre o processo inflamatório não deve ser descartado (TEIXEIRA et al., 2009). Saravia-Otten e colaboradores (2004) demonstraram que serinoproteases de peçonhas de serpentes apresentam um papel importante na ativação de metaloproteases endógenas, sugerindo a participação destas enzimas na inflamação local induzida por peçonhas. No entanto, um estudo *in vivo* mostrou que a injeção local da serinoprotease BjussuSP-I da peçonha de *B. jararacussu* em camundongos não promoveu ativação de metaloproteases de matriz (PÉREZ et al., 2007).

Nesse contexto, o presente trabalho apresenta dados sobre o isolamento, caracterização e análise comparativa de duas serinoproteases trombina-símile distintas da peçonha de *B. pirajai*, pertencentes a uma classe de enzimas que apresentam grande potencial médico-científico. Considerando os poucos dados literários disponíveis referentes à ação de serinoproteases de peçonhas de serpentes sobre o sistema complemento e o processo inflamatório, o presente estudo apresenta também a avaliação dos efeitos das serinoproteases de *B. pirajai* sobre as diferentes vias do complemento humano, além do potencial inflamatório destas enzimas pela análise da capacidade de indução de dor, edema e recrutamento de células do sistema imunológico.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Isolamento e caracterização bioquímica, enzimática, estrutural e funcional de duas serinoproteases da peçonha de *Bothrops pirajai*, fornecendo uma análise comparativa entre estas enzimas.

2.2. Objetivos específicos

- Isolamento de duas serinoproteases distintas, denominadas BpirSP27 e BpirSP41, a partir da peçonha bruta de *B. pirajai*.
- Determinação da massa molecular, presença de carboidratos N-ligados e ponto isoelétrico (pI) das duas enzimas.
- Determinação das sequências parciais de aminoácidos das serinoproteases unindo técnicas de espectrometria de massas e de degradação de Edman, seguido de alinhamento múltiplo e análise comparativa com sequências de serinoproteases de outras peçonhas de serpentes.
- Determinação da atividade proteolítica das enzimas sobre o fibrinogênio bovino na presença ou ausência de inibidores específicos.
- Determinação da atividade fibrinolítica e trombolítica das enzimas sobre coágulos de fibrina e de sangue *in vitro*.
- Determinação da atividade coagulante das serinoproteases sobre o plasma humano, com determinação da dose coagulante mínima (DCM).
- Avaliação da influência da N-glicosilação e de inibidores específicos sobre a atividade coagulante.
- Avaliação dos efeitos de variações de temperatura, pH e inibidores na atividade esterásica das serinoproteases sobre o substrato N- α -tosil-L-arginina metil éster (TAME).
- Determinação da atividade pró-coagulante das enzimas sobre os substratos cromogênicos S-2238, S-2222, S-2302, S-2266 e S-2251.

- Avaliação da influência de diferentes inibidores e íons metálicos sobre a hidrólise do substrato S-2238, específico para enzimas trombina-símile.
- Avaliação dos efeitos das serinoproteases sobre plaquetas lavadas.
- Avaliação da atividade das serinoproteases sobre as vias clássica/das lectinas (VC/VL) e alternativa (VA) do sistema complemento utilizando ensaios hemolíticos.
- Determinação do potencial pró-inflamatório das serinoproteases pela avaliação de seus efeitos edematogênicos e nociceptivos em ratos, além da análise do exsudato inflamatório induzido na cavidade peritoneal de camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Peçonha e outros materiais

A peçonha de *B. pirajai* foi adquirida do Serpentário *Bioagents* Proteínas Bioativas Ltda (Batatais-SP). As resinas cromatográficas e os reagentes para ensaios enzimáticos e bioquímicos foram obtidos da GE Healthcare, Merck ou Sigma-Aldrich. Os substratos p-nitroanilida S-2238, S-2222, S-2302, S-2266 e S-2251 foram obtidos da Chromogenix. Os equipamentos e demais materiais utilizados foram descritos no decorrer da metodologia e os reagentes não especificados foram de grau analítico.

3.1.2. Animais

Ratos Wistar machos (150-200 g) foram utilizados para a avaliação da indução de edema e dor pelas serinoproteases. Camundongos Balb/C fêmeas (18-20 g) foram utilizados nos ensaios para análise de exsudatos inflamatórios peritoneais induzidos pelas enzimas. As hemácias utilizadas para a avaliação dos efeitos sobre o sistema complemento foram obtidas de sangue de carneiros (para a VC/VL) ou coelhos adultos da linhagem Nova Zelândia (para a VA), mantidos respectivamente no Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para coleta periódica de sangue. Todos os experimentos envolvendo animais ou sangue proveniente deles foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto-SP (processo nº 08.1.192.53.7) (**Anexo A**).

3.1.3. Plasma e soro humano

O plasma humano utilizado nos experimentos de coagulação e efeito sobre plaquetas foi obtido a partir do sangue de voluntários sadios na faixa etária de 20 a 40 anos, de ambos os sexos e que não receberam medicação durante dez dias anteriores aos experimentos. O sangue dos doadores foi colhido por punção venosa

utilizando-se citrato de sódio 3,8% (9:1, v/v) como anticoagulante, sendo em seguida centrifugado a 2.000 *xg* ou a 200 *xg* em temperatura ambiente por 15 minutos para obtenção de plasma pobre em plaquetas (PPP) ou plasma rico em plaquetas (PRP), respectivamente.

O soro humano normal (SHN) utilizado nos ensaios sobre o sistema complemento foi obtido do sangue coletado dos voluntários e deixado coagular em temperatura ambiente por 1 h, separando o soro do coágulo por centrifugação a 500 *xg* por 10 minutos a 4°C. O soro foi reunido em *pools*, separado em alíquotas e congelado a -80°C até a realização dos experimentos. Todos os procedimentos envolvendo humanos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (CEP/FCFRP n° 123/2011) (**Anexo B**).

3.2. Isolamento das serinoproteases de *B. pirajai*

O fracionamento cromatográfico da peçonha de *B. pirajai* para obtenção das enzimas de interesse foi iniciado por exclusão molecular em Sephacryl S-200, seguida por cromatografia de afinidade em Benzamidine Sepharose 6B e por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), utilizando uma coluna μ RPC C2/C18 ST 4.6/100. Ambas as resinas cromatográficas e a coluna de fase reversa foram obtidas da GE Healthcare.

As absorbâncias das frações cromatográficas foram medidas em comprimento de onda de 280 nm utilizando espectrofotômetro *Thermo Scientific GENESYS 10UV* ou programa *UNICORN™ 5.11* para o sistema *ÄKTA™ purifier* (GE Healthcare). Em seguida, os dados foram plotados em gráficos utilizando o programa *Origin 8* para obtenção e análise dos perfis cromatográficos.

3.2.1. Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200

A peçonha bruta cristalizada (350 mg) de *B. pirajai* foi suspensa em 5 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6, seguida de centrifugação a 12.000 *xg* durante 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante límpido obtido foi aplicado a uma coluna cromatográfica contendo resina Sephacryl S-200 (110 x 2,5 cm), previamente equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6. Frações de 3 mL foram

coletadas por tubo de ensaio num fluxo de 30 mL/h a temperatura ambiente. A fração cromatográfica que apresentou atividade coagulante foi concentrada em sistema de ultrafiltração AMICON (Millipore) utilizando membrana Ultracel YM-10 e liofilizada antes de ser submetida à próxima etapa cromatográfica.

3.2.2. Cromatografia de afinidade em Benzamidine Sepharose

A fração coagulante obtida na etapa cromatográfica em Sephacryl S-200 foi diluída em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 (Tampão 1) e aplicada em coluna cromatográfica contendo resina Benzamidine Sepharose 6B (8,5 x 2,5 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição das frações foi feita utilizando três tampões de corrida: o tampão 1 já mencionado; tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 + NaCl 0,5 M (Tampão 2) e por último, tampão Glicina-HCl 0,02 M pH 3,2 (Tampão 3). O pH ácido do tampão 3 foi neutralizado adicionando-se 400 µL de Tris 1,0 M, pH 10,0 aos tubos de ensaio. Frações de 3 mL foram coletadas por tudo de ensaio num fluxo de 30 mL/h a temperatura ambiente. A fração coagulante foi concentrada e dessalinizada em sistema de ultrafiltração AMICON com membrana Ultracel YM-10, e em seguida liofilizada.

3.2.3. Cromatografia de fase-reversa em coluna C2/C18

A fração coagulante obtida na etapa cromatográfica em Benzamidine Sepharose apresentou duas possíveis isoformas de serinoproteases em gel de eletroforese e para separá-las, recorreu-se à coluna de fase reversa C2/C18, utilizando sistema ÄKTA™ purifier (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com solução de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (Solvente A), e a fração coagulante foi diluída neste mesmo solvente e aplicada no sistema utilizando loop de 500 µL. A eluição foi realizada no fluxo de 0,5 mL/min com gradiente de concentração segmentado de solução contendo acetonitrila 50% e TFA 0,1% (Solvente B): 0-60% de solvente B em 5 volumes de coluna e 60-100% de solvente B em 20 volumes de coluna.

3.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As frações cromatográficas e as enzimas isoladas foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (m/v) em condições desnaturantes, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, com base na metodologia descrita por Laemmli (1970).

O sistema de eletroforese utilizado é formado por uma mini cuba vertical para géis de tamanho 10 x 10,5 cm (modelo *Mini VE*, GE Healthcare) e uma fonte de energia (modelo *Electrophoresis Power Supply EPS 301*, GE Healthcare). O gel de resolução a 12% (m/v) em acrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 1:19 m/m) foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,8 e SDS 1%, enquanto que o gel de concentração a 6% em acrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 0,1%. Tris-Glicina 1X pH 8,3 foi utilizado como tampão de corrida (Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%).

As amostras foram acrescidas de 5 μ L de tampão desnaturante contendo Tris-HCl 0,05 M pH 6,5, glicerol 10% (v/v), β -mercaptoetanol 3,5% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,05% (m/v), e submetidas a fervura a 100°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras e padrões de massa molecular foram aplicados no gel e a corrida foi feita a 110 V e 15 mA por aproximadamente 2 h. O gel foi então corado por 15 minutos em azul de coomassie G-250 0,1% (m/v) dissolvido em água Milli-Q: metanol: ácido acético (40:50:10, v/v) e descorado em solução de ácido acético 10% e metanol 5% (v/v).

3.2.5. Quantificação de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas utilizando reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) conforme método descrito por Bradford (1976). A curva padrão foi determinada a partir de diferentes concentrações (0,1 a 2,0 mg/mL) de albumina de soro bovino (BSA).

3.3. Caracterização bioquímica

3.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes

A eletroforese na ausência de SDS e β -mercaptoetanol foi realizada em gel de poliacrilamida a 10% (m/v), de acordo com a técnica de Davis (1964) para proteínas ácidas. O tampão de corrida utilizado foi Tris-Glicina 1X pH 8,3 sem SDS, e as amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,025 M pH 6,8 contendo glicerol 50% (v/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v) como indicador. O sistema de eletroforese utilizado foi o mesmo descrito no item 3.2.4. e a corrida foi realizada a 200 V e 10 mA por aproximadamente 3 h. Em seguida, o gel foi corado e descorado como previamente descrito (item 3.2.4.).

3.3.2. Determinação da massa molecular

As massas moleculares das serinoproteases foram determinadas tanto por SDS-PAGE quanto por espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-TOF MS).

3.3.2.1. Determinação por SDS-PAGE

SDS-PAGE das serinoproteases isoladas foi realizada como descrito no item 3.2.4. e, em seguida, as massas moleculares das enzimas foram estimadas pela interpolação de uma curva logarítmica linear da massa molecular relativa das proteínas do padrão de massa molecular versus a distância de migração no gel. Dois padrões de peso molecular diferentes foram utilizados no decorrer do presente trabalho: SDS7 (Sigma-Aldrich), que consiste de sete proteínas com massas moleculares entre 14,2 e 66 kDa, e *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas Life Sciences), composto por dez proteínas com massas moleculares entre 10 e 260 kDa.

3.3.2.2. Determinação por MALDI-TOF MS

As análises foram feitas em espectrômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF, modelo *AXIMA Performance*, Shimadzu Biotech, Manchester, UK) e os espectros de massa foram adquiridos no modo linear positivo,

após calibragem do aparelho com padrões de proteína incluindo BSA, insulina, citocromo c, ribonuclease, apomiglobina e aldolase. As amostras foram diluídas em 50 µL de água Milli-Q e misturadas na proporção de 1:1 com a matriz composta de ácido sinapínico (10 mg/mL) em acetonitrila 50% e TFA 0,1%, e aplicadas na placa do MALDI. A faixa de massas moleculares avaliada foi de 3.000-100.000 m/z. Estas análises foram realizadas no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto em colaboração com o Prof. Dr. José César Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.3.3. *Ensaio de deglicosilação*

As enzimas deglicosilantes N-glicosidase F (PNGase F) e neuraminidase foram utilizadas de acordo com instruções do fabricante (New England BioLabs) para avaliar o grau de N-glicosilação das serinoproteases.

Para os testes com PNGase F, cada enzima purificada (200 µg) foi desnaturada por aquecimento a 100°C por 10 minutos na presença de 4 µL de tampão desnaturante (SDS 5% e ditioneitol - DTT 0,4 M), para um volume final de 40 µL. Em seguida, foram adicionados 8 µL de tampão de reação (fosfato de sódio 0,5 M pH 7,5), 8 µL de solução NP40 10% (utilizada para neutralizar o SDS do tampão desnaturante) e 2 µL de PNGase F (1000 U), completando com água Milli-Q para um volume final de 80 µL. Após incubação a 37°C por 24 horas, 10 µL das soluções reacionais foram separados para análise em SDS-PAGE a 12% (item 3.2.4.) e o restante das amostras foi utilizado para a determinação da atividade coagulante das enzimas deglicosiladas.

Para o tratamento com a enzima neuraminidase, cada serinoprotease (50 µg) foi desnaturada no mesmo tampão desnaturante usado acima para um volume final de 20 µL. Após aquecimento a 100°C por 10 minutos, foram adicionados às amostras 4 µL de tampão de reação (citrato de sódio 50 mM pH 6,0) e 3 µL de neuraminidase (150 U), completando com água Milli-Q para um volume final de 40 µL. A reação foi incubada a 37°C por 24 horas e 20 µL das soluções-teste foram avaliados em SDS-PAGE a 12% (item 3.2.4.).

3.3.4. Focalização isoeletrica

A focalização isoeletrica das serinoproteases foi realizada segundo método descrito por Vesterberg (1972), com pequenas modificações de acordo com Arantes et al. (1989).

Após o tratamento das placas, o gel foi preparado a 7% (m/v) em poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 0,8:30, m/m), contendo 10% (m/v) de sacarose, 1% (v/v) de anfólito pH 3,0-10,0 (*Pharmalyte*, Sigma-Aldrich), 0,17% (v/v) de TEMED (tetrametiletilenodiamina) e 0,075% (m/v) de persulfato de amônio. A solução a ser polimerizada foi adicionada a um sistema constituído por uma placa fina de vidro de 18 x 11 cm, montada entre duas placas grossas do mesmo tamanho fixadas por meio de pinças metálicas. Após a polimerização do gel, as placas grossas foram retiradas e a placa fina foi usada como suporte para o gel, que é então colocado sobre uma placa de porcelana refrigerada ligada a um banho termostaticado a 4°C (sistema *MultiphorTM II*, GE Healthcare). Duas tiras de papel foram utilizadas para conectar o gel e os eletrodos de platina, sendo o cátodo embebido em uma solução de hidróxido de sódio 1 M e o ânodo em ácido fosfórico 1 M. Os eletrodos de platina foram centralizados sobre as tiras de papel e o sistema foi então fechado. A fonte de alta voltagem (modelo *Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL*, GE Healthcare) foi ajustada para valores de 2000 V, 20 mA e 500 V.h para a realização de uma pré-focalização por 30 minutos. Em seguida, as amostras (10 µL) foram aplicadas diretamente no gel com a utilização de um pente e a focalização prosseguiu por aproximadamente 4 horas a 2000 V, 20 mA e 3000 V.h. Padrões de focalização isoeletrica (*IEF Standards*, faixa de pI 4,45-9,6, Bio-Rad) foram corridos em paralelo às amostras nas mesmas condições.

Após a focalização isoeletrica, desprezou-se 0,5 cm das laterais do gel e tiras de 1,0 x 2,0 cm foram seccionadas do mesmo, sendo colocadas em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de água Milli-Q para leitura do pH após 12 horas em repouso. Estas tiras foram cortadas nas laterais do gel intercaladamente, de forma a obter valores de pH para cada 0,5 cm do gel. Desta forma foi possível construir uma curva de pH versus a distância de migração no gel para o cálculo do pI das amostras. O restante do gel contendo as amostras foi fixado em solução de ácido tricloroacético a 20% (m/v) por 30 minutos e, após sucessivas lavagens com água Milli-Q, foi corado

com azul de coomassie G-250 0,1% (m/v) dissolvido em água Milli-Q: metanol: ácido acético (40:50:10, v/v) e descorado em solução de ácido acético 10% e metanol 5%.

3.4. Caracterização estrutural

3.4.1. Sequenciamento N-terminal

A região N-terminal das serinoproteases foi obtida pelo sequenciamento protéico de acordo com o método de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967), que consiste em três etapas: acoplamento, clivagem e conversão. Após os procedimentos de purificação, cada proteína foi aplicada diretamente em uma membrana de fibra de vidro (Wako, Japão), na concentração final de 10 pmol. A partir daí, o sequenciador automático de proteínas (sistema *PPSQ-33A*, Shimadzu) procedeu à análise da estrutura primária da enzima. O aminoácido derivado da reação com o fenilisotiocianato (PITC) foi convertido a feniltioidantoína (PTH)-aminoácido que foi então cromatograficamente separado em RP-HPLC. A quantificação e identificação das amostras foram realizadas pela comparação com padrão de 25 pmol analisado no início do sequenciamento. Este experimento foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Eliane C. Arantes Braga da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.4.2. Sequenciamento por espectrometria de massas

3.4.2.1. Sequenciamento realizado na Universidade de Barcelona

Inicialmente, as serinoproteases foram digeridas em gel com tripsina (grau de sequenciamento, Promega) em um digestor automático *ProGest Robot* da Genomic Solutions. Resumidamente, as bandas excisadas foram lavadas sequencialmente com bicarbonato de amônio 25 mM e acetonitrila. As proteínas foram reduzidas e alquiladas, respectivamente, pelo tratamento com solução de DTT 10 mM por 15 minutos a 56°C, seguido de tratamento com solução de iodoacetamida 55 mM por 15 minutos. Após lavagens sequenciais com tampão e acetonitrila, as proteínas foram digeridas *overnight* a 37°C com 80 ng de tripsina. Peptídeos tripticos foram extraídos da matriz de gel com ácido fórmico 10% e acetonitrila, reunidos e secos em uma centrifuga a vácuo.

O sequenciamento por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada a espectrometria de massas em tandem (RP-HPLC-MS/MS) foi realizado na Plataforma de Proteômica do Parque Científico de Barcelona, Universidade de Barcelona, Espanha, utilizando um equipamento NanoAcquity HPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massa OrbitrapVelos (Thermo Scientific). 4 μ L de cada amostra foram injetados e separados em uma coluna de fase reversa C18 (nanoACQUITY, 10 cm, 75 μ m ID, 1,7 μ m BEH, Waters) utilizando os solventes A: ácido fórmico 0,1% em água Milli-Q, e B: ácido fórmico 0,1% em acetonitrila. Os peptídeos ligados foram eluídos da coluna com o seguinte gradiente: 1-40% de solvente B em 20 minutos, seguido de um gradiente 40 a 60% de solvente B em 5 minutos, com fluxo de 250 nL/minuto. Os peptídeos eluídos foram ionizados na agulha do emissor nanospray PicoTipTM (New Objective), aplicando voltagem de 1900 V.

Cada amostra foi injetada duas vezes para ser analisada por dois métodos diferentes de espectrometria de massas. Em uma primeira análise, as massas dos peptídeos foram medidas em varredura completa do *Orbitrap* com resolução de 60.000 em m/z 400. Os cinco peptídeos mais abundantes (intensidade mínima de 500 contagens) foram selecionados de cada varredura e fragmentados usando CID (*collision-induced dissociation*) (38% de energia de colisão normalizada) no *ion trap* linear com hélio como gás de colisão. Em um segundo método, as massas dos peptídeos (m/z: 350-1800) foram medidas em varredura completa no *Orbitrap* com resolução de 60.000 em m/z 400. Os cinco peptídeos mais abundantes (intensidade mínima de 1500 contagens) foram selecionados de cada varredura e fragmentados na célula de colisão HCD (*higher-energy C-trap dissociation*) utilizando uma energia de colisão normalizada de 40% com nitrogênio como gás de colisão. Os fragmentos foram detectados na *Orbitrap* com resolução de 7500 FWHM em 400 m/z.

Dados brutos foram coletados com o programa *Thermo Xcalibur* (v.2.1.0.1140) e analisados com o programa *Thermo Proteome Discoverer* (v.1.2.0.208). Os dados foram então pesquisados com o motor de busca *Sequest* contra o banco de dados *UniProt* e com motor de busca MASCOT contra o NCBI nr. Os resultados da pesquisa foram filtrados por uma taxa de detecção falsa de 1% e somente aquelas proteínas que tinham dois ou mais peptídeos foram consideradas para a montagem das sequências de aminoácidos das enzimas. Estas análises

foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Saulo Luís da Silva da Universidade Federal de São João Del-Rei, Minas Gerais.

3.4.2.2. Sequenciamento realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto

As amostras das serinoproteases em bandas separadas por SDS-PAGE foram submetidas à digestão enzimática com tripsina (Promega). Inicialmente, SDS e corante coomassie blue foram removidos por 3 lavagens com 400 µL de bicarbonato de amônio 100 mM contendo 50% de acetonitrila, e em seguida, as amostras foram desidratadas com acetonitrila pura e secadas em centrífuga rotatória à vácuo (SpeedVac, Savant). As bandas de gel secas foram reidratadas com uma solução de tripsina a 0,5 µg/20 µL e após o completo intumescimento do gel foi adicionado um volume suficiente de bicarbonato de amônio 0,1 M para cobrir completamente o gel, sendo incubado a 37°C por 24 horas. A reação foi interrompida pela adição de 5 µL de ácido fórmico e mantida em temperatura ambiente para a extração dos peptídeos. O extrato foi conservado em freezer (-20°C) até o momento da análise por espectrometria de massas.

Os peptídeos trípticos das amostras foram preparados em coluna *ZipTip* contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol e equilibrada com ácido fórmico a 0,2%. As amostras foram carregadas na coluna e purificadas de sais e outros componentes hidrofílicos por 3 lavagens com 100 µL de ácido fórmico a 0,2%, sendo os peptídeos eluídos da resina com 30 µL de uma solução de metanol 60% em ácido fórmico 5%. Neste solvente, as amostras foram diretamente analisadas por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI MS) ou foram secas para que pudessem ser diluídas em matriz apropriada no caso de análise por MALDI-TOF MS.

Os peptídeos trípticos foram analisados em espectrômetro de massas tipo eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) utilizando uma origem eletrospray do tipo *nanoflow* contendo um capilar de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno, mantido a 4 kVolts e 40 V no cone de entrada e a uma temperatura de 100°C. As amostras foram introduzidas por uma bomba tipo seringa (Harvard, Inc, USA) a um fluxo de 300 nL/min e os espectros de massa foram coletados na forma de média de scans (15-30 scans) e processados com o software

MassLynx v. 3.3 (Micromass, Manchester, UK). A coleta de dados de massa utilizou varredura em MS1 (400-1500 u.m.a) obtendo-se assim a determinação da massa dos peptídeos (*peptide mass fingerprint*). Cada íon de peptídeo detectado foi submetido a CID-MS/MS (*daughter ion scanning*) que promove a fragmentação do íon selecionado por colisão com argônio na pressão parcial de $3,0 \times 10^{-3}$ mBar e energia variando entre 20-30 eV, originando fragmentos de íons do tipo *b* e *y* que foram utilizados para a dedução das respectivas sequências de aminoácidos dos peptídeos pelo programa *Biolynx* (Micromass, Manchester, UK).

Para as análises em MALDI-TOF/TOF utilizou-se um espectrômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (AXIMA Performance, Shimadzu Biotech, Manchester, UK). As amostras foram diluídas em solução contendo ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL) e aplicadas manualmente na placa de MALDI, que foi então deixada a temperatura ambiente para cristalização completa da matriz. Em seguida, a avaliação das amostras foi feita no modo automático.

Os dados gerados por MS foram submetidos aos bancos de dados NCBI e Swiss-Prot utilizando os sites BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) na tentativa de identificar sequências homólogas de proteínas para fins comparativos. Estes experimentos foram realizados no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto em colaboração com o Prof. Dr. José César Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.4.3. Alinhamento múltiplo das sequências parciais obtidas

As sequências parciais de aminoácidos das duas serinoproteases foram comparadas entre si e com outras obtidas nos bancos de dados já citados por alinhamento múltiplo utilizando o programa *ClustalX* versão 2.0.11. (<http://www.clustal.org/>).

3.5. Caracterização enzimática

3.5.1. Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica das serinoproteases foi determinada segundo metodologia descrita por Edgar e Prentice (1973) com modificações.

Amostras contendo fibrinogênio bovino (80 µg) em água Milli-Q foram incubadas com diferentes doses das enzimas (1, 2, 4, 8 e 16 µg em água Milli-Q) a 37°C por 2 h. A reação foi interrompida por adição de 5 µL de tampão desnaturante e fervura a 100°C durante 5 minutos, analisando em seguida as amostras por SDS-PAGE a 12% (item 3.2.4.). A atividade proteolítica das serinoproteases sobre o fibrinogênio bovino também foi avaliada após pré-incubação das enzimas com inibidores específicos (PMSF 5 mM e benzamidina 5 mM) por 30 minutos a 37°C.

3.5.2. Atividade fibrinolítica

A atividade fibrinolítica das enzimas foi avaliada de acordo com o método descrito por Leitão e colaboradores (2000), utilizando soluções (10 mL) de fibrinogênio bovino 0,3% (m/v) e agarose 0,95% (m/v) preparadas em tampão barbital 0,05 M pH 7,8, contendo CaCl₂ 1,66 mM, MgCl₂ 0,68 mM e NaCl 94 mM. A solução de agarose foi aquecida em micro-ondas até a formação de um coloide transparente e após resfriamento até 40°C, adicionou-se a solução de fibrinogênio na proporção de 1:1 (v/v). A esta mistura foram adicionados 100 µL de solução de trombina (1 µg/µL), vertendo o conteúdo em placas de Petri plásticas (85 x 10 mm) para a formação do coágulo de fibrina. As placas foram mantidas a 4°C por 30 minutos e em seguida foram feitos orifícios de 5 mm de diâmetro para aplicação das amostras. Diferentes quantidades das enzimas (2, 4, 8, 16 e 32 µg em água Milli-Q para um volume final de 30 µL) foram adicionadas em cada orifício do gel de fibrina e em seguida as placas foram incubadas por 24-48 h a 37°C. A análise foi feita visualmente e quantificada pelos halos de lises produzidos (em centímetros), comparando com um controle positivo (40 µg de peçonha bruta de *B. pirajai*) e um controle negativo (salina tamponada com fosfato - PBS).

3.5.3. Atividade trombolítica

A atividade trombolítica das serinoproteases foi avaliada sobre coágulos sanguíneos formados *in vitro* colocando 500 µL de sangue fresco (coletado de voluntários como descrito no item 3.1.3., porém na ausência de anticoagulante) em placas de 24 poços e deixando o mesmo coagular por 1 h em temperatura ambiente. Após este período, os coágulos foram incubados por 24-48 horas a 37°C com diferentes doses das enzimas (25, 50 e 100 µg em 500 µL de PBS), utilizando PBS (500 µL) e peçonha bruta de *B. pirajai* (50 µg em 500 µL de PBS) como controles negativo e positivo, respectivamente. Após incubação, a atividade trombolítica foi estimada baseando-se no tamanho do coágulo remanescente, medindo dois ângulos retos e expressando os resultados em centímetros, como descrito por De Toni (2011).

3.5.4. Atividade esterásica

A atividade esterásica das enzimas foi determinada usando o substrato N α -p-tosil-L-arginina metil éster (TAME), de acordo com metodologia de Hummel (1959) com modificações.

A atividade foi avaliada pela absorbância a 247 nm após 30 minutos de reação das serinoproteases com o TAME 1 mM (concentração final) a 37°C. As misturas reacionais consistiam de 2,5 mL de tampão Tris-HCl 0,02 M e KCl 0,15 M pH 8,1, 0,3 mL de TAME 0,01 M e 0,2 mL de solução contendo 5 µg de enzima em água Milli-Q, completando um volume final de 3,0 mL. Uma unidade de TAME representa o aumento de 0,01 unidades de absorbância resultante da atividade hidrolítica das enzimas sobre o substrato. Os resultados foram expressos como atividade específica, referente a unidades de TAME por miligrama de proteína (U/mg).

Para a avaliação da estabilidade das serinoproteases frente a variações de temperatura e pH, as enzimas foram pré-incubadas por 30 minutos em diferentes temperaturas (4, 25, 37, 45, 60 e 100°C) e tampões de pH (3,0; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0; 10,5) a 37°C, e suas atividades foram em seguida testadas sobre o TAME. A atividade das enzimas também foi avaliada após pré-incubação por 30 minutos a 37°C na presença de diferentes inibidores a 1 mM (PMSF, benzamidina, leupeptina,

aprotinina, β -mercaptoetanol, DTT, ácido etilenodiamino tetracético - EDTA, ácido etilenoglicol tetracético - EGTA e 1,10-fenantrolina).

3.5.5. Atividade pró-coagulante

Os substratos cromogênicos S-2238 (para enzimas trombina-símile), S-2222 (para fator Xa), S-2266 (para calicreína glandular e fator XIa), S-2302 (para calicreína plasmática, fator XIa e XIIa) e S-2251 (para plasmina) foram utilizados para a avaliação da atividade pró-coagulante das serinoproteases.

A hidrólise dos substratos (0,4 mM, concentração final) foi determinada pela reação com diferentes concentrações das enzimas (2,5; 5; 10; 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$), monitorando a reação enzimática (volume final de 100 μL) a 405 nm em microleitor *PowerWave XS2* (BioTek) por 10 minutos a 37°C. Em seguida, as absorbâncias dos brancos, referentes apenas aos substratos cromogênicos, foram subtraídas dos valores de absorbância obtidos para as reações com as serinoproteases.

O substrato S-2238 também foi utilizado para determinar a ação de inibidores e cátions metálicos sobre a atividade das serinoproteases. Para isso, as enzimas (20 $\mu\text{g/mL}$) foram pré-incubadas com os inibidores PMSF (1 mM), benzamidina (5 mM) ou EDTA (10 mM), ou com cátions divalentes a 10 mM (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+}) por 30 minutos a 37°C, e a reação foi então iniciada com a adição de S-2238 (0,4 mM, concentração final), monitorando a absorbância a 405 nm por 10 minutos a 37°C. Parte destas atividades foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro.

3.6. Caracterização funcional

3.6.1. Atividade coagulante sobre plasma

3.6.1.1. Determinação da dose coagulante mínima (DCM)

A DCM das serinoproteases, considerada como a quantidade de enzima capaz de coagular o plasma em 60 segundos (THEAKSTON; REID, 1983), foi determinada usando 150 μL de plasma humano citratado a 37°C e diferentes quantidades das enzimas (1 a 20 μg diluídos em água Milli-Q para um volume final

de 50 μ L). O tempo de coagulação, medido em segundos, foi caracterizado pelo aparecimento de rede de fibrina ou formação imediata do coágulo.

3.6.1.2. Determinação da atividade coagulante por ensaio cinético

Os ensaios cinéticos foram realizados em microleitor *PowerWave XS2* (BioTek) usando 150 μ L de plasma humano citratado a 37°C e 1 μ g das enzimas em água Milli-Q para um volume final de 50 μ L, monitorando a absorbância a 405 nm por 30 minutos pelo programa *Gen5 Data Analysis*. Para determinar a influência de carboidratos N-ligados (N-glicanas) e de inibidores de serinoproteases na atividade coagulante das enzimas, estas foram tratadas com PNGase F como previamente descrito (item 3.3.3.) ou pré-incubadas com PMSF, leupeptina e benzamidina (5 mM) por 30 minutos a 37°C antes do início do ensaio cinético.

3.6.2. *Efeitos sobre plaquetas*

Os ensaios sobre plaquetas foram realizados em agregômetro plaquetário (Chrono-log Corporation, modelo 490 2D), com a utilização do software *AggroLink*. A agregação plaquetária foi monitorada turbidimetricamente de acordo com a metodologia de Carlini e colaboradores (1985) e Fuly e colaboradores (1997; 2002), com algumas modificações.

Para a obtenção de plaquetas lavadas (WP), o sangue coletado dos doadores (item 3.1.3.) foi centrifugado a 200 $\times g$ por 15 minutos, obtendo-se plasma rico em plaquetas (PRP) que foi novamente centrifugado a 2.000 $\times g$ por 15 minutos. O “pellet” de plaquetas formado (precipitado) foi ressuspenso em tampão Tyrode (NaCl 0,137 M, KCl 2 mM, NaHCO₃ 11 mM, NaH₂PO₄ 0,4 mM, glicose 5,5 mM, albumina bovina 0,35% m/v) pH 6,5 acrescido de EGTA 0,1 mM e MgCl₂ 1 mM. O mesmo procedimento foi realizado para “lavar” as plaquetas por mais duas vezes com o mesmo tampão, até que o “pellet” final foi ressuspenso em um volume de Tyrode (sem EGTA e MgCl₂) pH 7,5 equivalente a 75% do volume de PRP obtido na primeira centrifugação. Assim, as plaquetas lavadas (WP) foram obtidas em uma concentração aproximada de $3-4 \times 10^5$ plaquetas/mL e mantidas em tubos plásticos a temperatura ambiente até a realização dos experimentos.

Os ensaios foram realizados utilizando-se 300 μL de WP com ou sem acréscimo de CaCl_2 (2 mM, concentração final), mantidos a 37°C em cubetas de vidro siliconizadas e sob agitação constante. Para avaliar o efeito das enzimas sobre as plaquetas, estas foram adicionadas diretamente sobre o WP, em concentrações entre 16 e 115 $\mu\text{g/mL}$, e então a agregação plaquetária foi monitorada por 10 minutos. Estes ensaios foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. André L. Fuly da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro.

3.6.3. *Efeitos sobre o sistema complemento*

Os efeitos das serinoproteases de *B. pirajai* sobre o sistema complemento humano foram observados por meio de ensaios *in vitro* da atividade hemolítica promovida pelo soro humano normal (SHN), fonte de componentes do complemento, pré-incubado por 1 h a 37°C com diferentes concentrações das enzimas. Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.6.3.1. Via clássica/via das lectinas (VC/VL)

O sangue de três carneiros foi colhido por punção venosa na veia jugular em mesmo volume de solução estéril de Alsever (glicose 2,05%, citrato de sódio 0,8% e NaCl 0,42%), sendo aliqotado e conservado a 4°C até sua utilização nos experimentos. No dia dos ensaios, alíquotas do sangue foram centrifugadas a 500 xg por 10 minutos, e o sedimento de hemácias foi então lavado com tampão trietanolamina pH 7,4 contendo CaCl_2 $1,4 \times 10^{-4}$ M, MgSO_4 5×10^{-4} M e gelatina 0,1% (tampão $\text{TEA-Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$), preparando uma suspensão de hemácias a 5% contendo aproximadamente $1,2 \times 10^9$ células/mL (ALMEIDA; FIFE, 1976). Em seguida, esta suspensão foi sensibilizada com hemolisina (anticorpo de coelho anti-hemácias de carneiro, obtido de acordo com ALMEIDA; FIFE, 1976) na titulação de 1:800, para sensibilização máxima. A suspensão de hemácias sensibilizadas foi mantida a 4°C por 15 minutos e a absorbância em 700 nm foi ajustada para 0,7-0,8 em espectrofotômetro (Beckman DU-70). Os ensaios de atividade hemolítica utilizados não permitem a distinção entre as VC e VL do complemento, já que ambas

as vias têm os componentes C2, C4 e a C3 convertase em comum (WAGNER; FRANK, 2010).

3.6.3.2. Via alternativa (VA)

O sangue de dois coelhos foi colhido por punção da artéria auricular central em mesmo volume de solução estéril de Alsever (glicose 2,05%, citrato de sódio 0,8% e NaCl 0,42%). Após filtração em gaze, o sangue foi incubado com mesmo volume de solução quelante de cálcio e magnésio TEA-EDTA por 15 minutos a 37°C. Em seguida, alíquotas do sangue foram lavadas com tampão trietanolamina pH 7,4 contendo EGTA 8×10^{-3} M, MgSO_4 2×10^{-3} M e gelatina 0,1% (tampão TEA-EGTA- Mg^{2+}), preparando uma suspensão de hemácias a 5% neste tampão e ajustando a absorbância em 700 nm para 0,7-0,8 em espectrofotômetro (*Beckman DU-70*).

3.6.3.3. Ensaio de atividade hemolítica por método cinético

O método cinético para a determinação da atividade hemolítica é baseado na mudança das propriedades de dispersão de luz das hemácias à medida que estas vão sofrendo hemólise, sendo medido espectrofotometricamente a 700 nm. A atividade hemolítica é determinada pela medida do tempo (em segundos) necessário para ocorrer lise de 50% das hemácias presentes no meio reacional ($t_{1/2}$). O $t_{1/2}$ é diretamente proporcional à porcentagem de redução da atividade hemolítica promovida pelo sistema complemento (CROTT et al., 1997). Antes dos ensaios sobre o complemento, as serinoproteases foram investigadas quanto à capacidade de induzir hemólise direta, incubando-as com hemácias de coelho ou carneiro na ausência de SHN.

Os ensaios para a VC/VL foram realizados em microplacas de 96 poços, com os controles negativos sendo constituídos de 193 μL de tampão TEA- Ca^{2+} - Mg^{2+} e 7 μL de SHN (obtido como descrito no item 3.1.3.), completando um volume final de 200 μL . Diluições seriadas das serinoproteases em diferentes concentrações (25 a 200 $\mu\text{g/mL}$) foram preparadas em tampão TEA- Ca^{2+} - Mg^{2+} , e em seguida 193 μL de cada diluição foram aplicados na microplaca, juntamente de 7 μL de SHN para perfazer um volume final de 200 μL . As placas foram mantidas a 37°C por uma hora,

e após este período de incubação, foram adicionados 40 µL/poço de hemácias de carneiro sensibilizadas. As misturas reacionais foram homogeneizadas e a leitura das absorbâncias em 700 nm foi realizada imediatamente em microleitor (*SpectraMax Plus*, Molecular Devices).

Os ensaios para a VA foram feitos de maneira similar, utilizando, porém, maior volume de SHN e tampão TEA-EGTA-Mg²⁺, como descrito a seguir. Os poços para os controles negativos receberam 140 µL do tampão TEA-EGTA-Mg²⁺ e 60 µL de SHN, enquanto os poços reacionais receberam 140 µL de diferentes diluições das serinoproteases em tampão TEA-EGTA-Mg²⁺ e 60 µL de SHN (volume final de 200 µL/poço). Em seguida, as placas foram mantidas a 37°C por uma hora, e após este período de incubação, foram adicionados 40 µL/poço de hemácias de coelho. As misturas reacionais foram homogeneizadas e a leitura das absorbâncias em 700 nm foi realizada imediatamente em microleitor.

As absorbâncias em 700 nm foram registradas acompanhando-se a cinética de hemólise dos meios reacionais por 15 minutos. A partir dos resultados obtidos, foi calculado o valor de $t_{1/2}$ para cada poço, correspondente ao tempo necessário para que a absorbância inicial da mistura da reação seja reduzida pela metade. A porcentagem de inibição da atividade hemolítica foi calculada para cada concentração das serinoproteases de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{t_{1/2} \text{ do poço controle} \times 100}{t_{1/2} \text{ do poço com amostra}} \right)$$

A atividade das enzimas sobre a VC/VL e a VA do sistema complemento foi expressa em valores estimados de IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% da hemólise), determinada por cálculos de regressão linear utilizando os percentuais de inibição *versus* concentrações das serinoproteases.

3.6.3.4. Quantificação de endotoxinas nas amostras

Uma vez que endotoxinas bacterianas (lipopolissacarídeos - LPS) podem agir sobre o sistema complemento, sua presença nas amostras analisadas poderia interferir nos resultados, levando a um falso positivo. Desta forma, a quantidade de LPS nas amostras foi testada pelo kit *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) QCL-1000®

(Lonza), que utiliza um lisado de amebócitos modificados (LAL) e um substrato colorimétrico sintético para detectar endotoxinas cromogenicamente. Estes ensaios foram realizados em microplacas a 405 nm, de acordo com as instruções do fabricante, avaliando as serinoproteases após pré-incubação a 37°C com excesso do inibidor benzamidina (20 mM) por 1 h para garantir que suas atividades enzimáticas não influenciariam no teste. A quantificação de endotoxinas foi feita com base em uma curva padrão construída com diferentes concentrações de endotoxina de *Escherichia coli* (0,1 a 1,0 EU/mL).

3.6.4. Efeitos pró-inflamatórios

Os experimentos de indução de edema e hiperalgesia foram realizados no laboratório de Biologia Molecular e Celular (Instituto de Ciências Biomédicas) em colaboração com o Prof. Dr. Fábio de Oliveira da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. A análise dos exsudatos inflamatórios formados na cavidade peritoneal de camundongos após injeção das serinoproteases foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.6.4.1. Atividade edematogênica

O edema induzido pelas enzimas foi avaliado em ratos Wistar machos pesando de 150 a 200 g. Grupos de animais (n=4) receberam diferentes doses das enzimas (10, 25 e 50 µg) diluídas em 50 µL de salina estéril (NaCl 0,15 M) por via intraplantar na pata posterior esquerda dos animais. A pata posterior direita recebeu apenas salina como controle negativo. Os volumes de ambas as patas foram medidos usando pletismômetro (Ugo Basile, Itália, modelo 7140) após diferentes intervalos de tempos (1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas), de acordo com Van Arman e colaboradores (1965). Os resultados foram calculados pela diferença entre os valores obtidos para ambas as patas e expressos em porcentagem de aumento do volume da pata em relação às medidas iniciais.

3.6.4.2. Hiperalgesia

Os mesmos animais utilizados para a atividade edematogênica (item 3.6.4.1.) foram utilizados para a avaliação da hiperalgesia promovida pelas serinoproteases. O limiar de dor foi medido em diferentes momentos após a injeção de solução salina ou das serinoproteases com o aparelho de pressão (Ugo-Basile), como descrito por Randall e Selitto (1957). O peso em gramas necessário para provocar uma resposta nociceptiva (flexão da pata) foi determinado como o limiar nociceptivo. Um valor de corte de 300 g foi usado para evitar danos às patas. O limiar nociceptivo foi medido antes e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção das amostras. Os resultados foram calculados pela diferença entre ambas as patas e expressos em percentagem do decréscimo do limiar nociceptivo em relação ao limiar inicial. Para reduzir o estresse, os ratos foram habituados ao aparelho um dia antes dos experimentos.

3.6.4.3. Análise do exsudato inflamatório peritoneal

Camundongos Balb/C (3 animais/grupo experimental) foram injetados via intraperitoneal com 500 µL de PBS (controle negativo) ou soluções contendo diferentes doses das serinoproteases de *B. pirajai* (25, 50 e 100 µg diluídos em 500 µL de PBS). Após 6 e 24 h, os animais foram submetidos à eutanásia pela instilação de CO₂. Para análise das células inflamatórias, a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de PBS gelado, drenando assepticamente o exsudato com auxílio de uma seringa e transferindo para tubos plásticos de 15 mL, mantidos em seguida em banho de gelo. A contagem do número total de leucócitos presentes no lavado foi feita analisando cada amostra de exsudato, diluída em solução de Turk (1/20), em câmara de Neubauer. Para realizar a contagem diferencial dos leucócitos em neutrófilos e células mononucleares, amostras de células (100 µL do lavado peritoneal dos diferentes grupos experimentais) foram concentradas em lâminas de microscópio utilizando citocentrífuga (*Cytospin 3*, Shandon Souther Products Ltd., UK), coradas com corante de Romanowsky e analisadas em microscópio óptico (Bioval), magnificação 400X. Foram contadas 300 células por lâmina e os resultados foram expressos pelas porcentagens médias de cada tipo celular observado.

3.7. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata e os resultados foram expressos pelas médias dos valores e desvios padrões (SD). A significância estatística dos resultados foi avaliada com o programa *GraphPad Prism 5* utilizando teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey, considerando os valores de $p < 0,05$ como significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento das serinoproteases de *B. pirajai*

O fracionamento da peçonha bruta de *B. pirajai* para obtenção das serinoproteases de interesse foi realizado por três etapas cromatográficas consecutivas. Na primeira etapa, 350 mg da peçonha foram aplicados em coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200, resultando em cinco frações cromatográficas: S1a, S1b, S2, S3 e S4 (**Fig. 4A**). Amostras destas frações foram avaliadas quanto à atividade coagulante, sendo a fração S1b a única a apresentar tal atividade. Depois da retirada de sal e liofilização, a fração coagulante S1b foi diluída no tampão de corrida e aplicada em coluna de afinidade Benzamidine Sepharose 6B, resultando em quatro frações cromatográficas: B1a, B1b, B2 e B3 (**Fig. 4B**). A fração B3 desta cromatografia apresentou maior atividade coagulante e, quando avaliada em SDS-PAGE, mostrou duas possíveis serinoproteases com massas moleculares de aproximadamente 45 e 30 kDa (gel inserido na **Fig. 4B**). Para separá-las, recorreu-se à cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18, obtendo o perfil representado na figura **4C**, que mostra também o SDS-PAGE em condições desnaturantes das duas serinoproteases devidamente separadas após as três etapas cromatográficas utilizadas. As duas enzimas também foram avaliadas em condições não desnaturantes em géis de poliacrilamida para proteínas básicas (resultados não mostrados) e ácidas (**Fig. 4D**), mostrando serem enzimas ácidas (como confirmado adiante com a determinação de seus pontos isoelétricos), já que ambas foram capazes de migrar apenas em PAGE ácida.

Os cálculos de rendimento para este processo de isolamento indicam uma baixa quantidade de ambas as enzimas na peçonha de *B. pirajai*, sendo que cada serinoprotease representou em torno de 0,5% da massa total da peçonha bruta utilizada no presente estudo. Dessa forma, as etapas de isolamento descritas acima foram repetidas diversas vezes para purificar e acumular quantidade suficiente das duas enzimas para os testes bioquímicos e funcionais.

Figura 4. Purificação das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 da peçonha de *Bothrops pirajai*. (A) Fracionamento de 350 mg da peçonha bruta em coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200 equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,6. Foram coletados 3 mL/tubo em um fluxo de 30 mL/h e temperatura ambiente. (B) Fracionamento da fração coagulante S1b em coluna de afinidade Benzamidine Sepharose 6B. A fração foi aplicada à coluna equilibrada e eluída com tampão 1: Tris-HCl 0,05 M pH 7,6, seguida de eluição com tampão 2: Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,5 M pH 7,6 e tampão 3: Glicina-HCl 0,02 M pH 3,2, coletando-se 3 mL/tubo em fluxo de 30 mL/h e temperatura ambiente. Inserido no canto superior esquerdo, SDS-PAGE da fração B3. (C) Fracionamento da fração coagulante B3 em coluna de fase reversa C2/C18 usando sistema AKTA Purifier e eluição com TFA 0,1% (solvente A) e acetonitrila 50% + TFA 0,1% (solvente B), em fluxo de 0,5 mL/minuto. Inserido, SDS-PAGE das duas frações resultantes. Amostras: 1- pico 1 (BpirSP41); 2- pico 2 (BpirSP27); 3- Padrão de massa molecular. (D) Eletroforese em gel de poliácridamida em condições não desnaturantes para proteínas ácidas. Amostras: 1- BpirSP27; 2- BpirSP41.

4.2. Determinação das massas moleculares

As massas moleculares das serinoproteases de *B. pirajai* foram inicialmente determinadas por SDS-PAGE, utilizando quantidades crescentes das duas enzimas (1 a 16 μ g) como mostrado na figura 5. Visualmente, pode-se notar que uma das enzimas apresenta massa pouco acima do padrão de massa molecular de 29 kDa (**Fig. 5A**), enquanto a outra apresenta massa próxima ao padrão de 45 kDa (**Fig. 5B**). A estimativa das massas moleculares das enzimas foi feita pela interpolação de uma curva logarítmica linear da massa molecular relativa das proteínas do padrão versus a distância de migração no gel, obtendo-se as massas aproximadas de 32 kDa para a BpirSP27 e 49 kDa para a BpirSP41 (resultados não mostrados).

Figura 5. Determinação das massas moleculares das serinoproteases isoladas de *B. pirajai* por SDS-PAGE a 12%. (A) BpirSP27 e (B) BpirSP41. Amostras: 1- 1 μ g; 2- 2 μ g; 3- 4 μ g; 4- 8 μ g; 5- 16 μ g; 6- Padrão de massa molecular.

As serinoproteases de *B. pirajai* foram nomeadas de acordo com a determinação por MALDI-TOF/TOF MS em modo linear, que mostrou massas moleculares de aproximadamente 27 kDa (denominada BpirSP27) (**Fig. 6A**) e 41 kDa (denominada BpirSP41) (**Fig. 6B**). Os espectros de massa também mostram picos de massas inferiores a 20 kDa, possivelmente pertencentes a produtos de proteólise ou a pequenos contaminantes das amostras, além de picos de massas duas ou três vezes as massas das serinoproteases, correspondentes a possíveis dímeros e trímeros formados nas amostras analisadas (**Fig. 6**).

Figura 6. Determinação das massas moleculares das serinoproteases isoladas de *B. pirajai* por espectrometria de massas. (A) BpirSP27 e (B) BpirSP41. As análises foram feitas em espectrômetro de massas tipo duplo TOF com fonte MALDI (MALDI-TOF/TOF) e os espectros de massa foram adquiridos no modo linear positivo.

4.3. Determinação do grau de N-glicosilação

O tratamento das serinoproteases com a endoglicosidase PNGase F (que aparece no gel da figura 7 como uma banda de massa molecular próxima de 36 kDa nas linhas 2 e 6) mostrou que as enzimas apresentam diferentes graus de ligação de N-glicanas. Para a BpirSP27, a diminuição da massa molecular (estimada pela curva logarítmica linear da massa molecular relativa das proteínas do padrão de massa molecular versus a distância de migração das amostras no gel) foi de aproximadamente 32 para 27 kDa (15%), enquanto que para a BpirSP41 a redução aproximada foi de 49 para 28 kDa (42%) (**Fig. 7**). Já o tratamento com a exoglicosidase neuraminidase (que aparece no gel da figura 7 como uma banda de massa molecular próxima de 43 kDa nas linhas 3 e 7) não mostrou redução visível em SDS-PAGE na massa molecular de nenhuma das serinoproteases (**Fig. 7**).

Figura 7. SDS-PAGE a 12% em condições desnaturantes das serinoproteases de *B. pirajai* tratadas ou não com enzimas deglicosilantes. A reação de deglicosilação foi feita por incubação das enzimas (40 µg) com PNGase F (200 U) ou Neuraminidase (150 U) a 37°C por 24 h. Amostras: **1-** BpirSP41; **2-** BpirSP41 + PNGase F; **3-** BpirSP41 + Neuraminidase; **4-** Padrão de massa molecular; **5-** BpirSP27; **6-** BpirSP27 + PNGase F; **7-** BpirSP27 + Neuraminidase.

4.4. Determinação do ponto isoelétrico (pI)

A focalização isoelétrica das serinoproteases confirmou que ambas são proteínas ácidas, sendo o pI aproximado da BpirSP27 de 4,7 e o da BpirSP41 de 3,7 (**Fig. 8**), conforme determinado pela curva de pH versus a distância de migração no gel (resultados não mostrados).

Figura 8. Focalização isoelétrica das serinoproteases de *B. pirajai* em gel de poliacrilamida a 7%. Amostras: **(A)** BpirSP27 (pI ~ 4,7) e **(B)** BpirSP41 (pI ~ 3,7). O pI das amostras foi calculado pela curva de pH versus a distância de migração no gel, como descrito no item 3.3.4. Padrões de focalização isoelétrica (*IEF Standards*, faixa de pI 4,45-9,6, Bio-Rad) foram corridos em paralelo às amostras nas mesmas condições para confirmar a validade do experimento.

4.5. Sequenciamento parcial das serinoproteases

Com a união dos métodos de degradação de Edman e digestão trípica foi possível determinar parte das sequências de aminoácidos das serinoproteases de *B. pirajai*, obtendo-se 148 resíduos de aminoácidos para a BpirSP27 e 128 para a BpirSP41. O alinhamento múltiplo das sequências parciais das duas enzimas (**Fig. 9**) foi realizado levando-se em consideração as posições mais prováveis para os peptídeos trípticos obtidos e o número total de aminoácidos esperado para as enzimas em relação a outras sequências de serinoproteases depositadas no banco de dados do NCBI.

De acordo com o número de aminoácidos totalmente conservados (*) presentes, pode-se dizer que as sequências parciais das serinoproteases apresentam identidade de 61%, exibindo ainda várias substituições conservativas de aminoácidos (: ou .). Tais variações mostram que as diferenças das duas enzimas vão além da quantidade de carboidratos N-ligados, sendo possivelmente refletidas também em diferenças estruturais e funcionais significativas.

Figura 9. Comparação entre as sequências parciais de aminoácidos das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 da peçonha de *B. pirajai*. O alinhamento múltiplo das sequências foi feito pelo programa *ClustalX* v. 2.0.11. (*) indica posição com resíduo de aminoácido totalmente conservado; (:) indica conservação de um dos seguintes grupos com alto score: K/R/Q/H, S/A, K/N/D, F/L/V/I, E/D/N/Q, T/S/A, I/M/L; (.) indica conservação de um dos seguintes grupos de menor score: N/R/G, G/D/N, A/V/T, Q/K/E/R, S/K/G/A, D/K/H, C/S, T/P.

Considerando as diferenças entre as sequências parciais obtidas para a BpirSP27 e a BpirSP41, alinhamentos múltiplos separados foram feitos pelo programa *ClustalX* v. 2.0.11 para cada uma das enzimas, comparando-as com sequências depositadas no NCBI de serinoproteases de peçonhas de outras espécies de serpentes, conforme apresentado nas figuras **10** e **11**.

	1	50
BpirSP27 [Bothrops pirajai]	VVGDECNINEHRSLVAFNSTGFFCSGILLNQEWVLTASHCDSSTNFMK	
HS114 [Bothrops jararaca]	VVGDECNINEHRSLVAFNSTGFFCSGILLNQEWVLTASHCDSSTNFMK	
SP4 [Crotalus adamanteus]	VVGDECNINEHRSLVAFNSTEFFCSGTLINQEWVVTAAHCDSSTNFMK	
Catroxase II [Crotalus atrox]	VVGDECNINEHRSLVAFNSTEFFCSGTLINQEWVVTAAHCDSSTNFMK	
Defibrase [Gloydius ussuriensis]	VIGDECNINEHRSLVAFNSTGFFCSGTLVNEEWVLSAAHCDSSTNFMK	
TLE [A. piscivorus leucostoma]	VVGDECNINEHRSLVAFNSTGFFCSGTLINQEWVLTAAHCDSKNFQIK	
Stejnefibrase 2 [V. stejnegeri]	VVGDECNINEHRSLVAFNSTGFFCSGTLINQEWVVTAAHCDSKNFQIK	
Contortrixobin [A. c. contortrix]	VVGDECNINEHRSFLVAFNSNGFVCSGTLINQEWVLTAAHCDSSTDFQIK	
SP1 [Trimeresurus gramineus]	VVGDECNINEHRSLVAFNSTGFFCSGTLINQEWVVTAAHCDSNNFMK	
Dav-PA [Deinagkistrodon acutus]	VIGNECDINEHRSFLVAFNTTGFFCGGTLINPEWVVTAAHCDSSTNFMQ	
	*:***:**** *::***: . *. * *::*:****:.*:::	
	51	100
BpirSP27 [Bothrops pirajai]	-----KKTLLNQDEQTRN-----KNDALDKDLMLVRLDSPVSDSE	
HS114 [Bothrops jararaca]	IGVHSEKTLNQDEQTRNPKEKIFCPNKKNDALDKDLMLVRLDSPVSDSE	
SP4 [Crotalus adamanteus]	LGVHSEKVPNEDEQTRNPKEKFFCPNKKKDDVLDKDIMLIKLDSPVSNSE	
Catroxase II [Crotalus atrox]	LGVHSEKVPNEDEQTRNPKEKFFCPNKKKDDVLDKDIMLIKLDSPVSNSE	
Defibrase [Gloydius ussuriensis]	LGVHSEKVLNEDEQTRNPKEKFCIPNKKNDVLDKDIMLIKLDSPVSNSE	
TLE [A. piscivorus leucostoma]	LGVHSEKVLNEDEQTRNPKEKFCIPNKKYDKVLDKDIMLIKLDSPVSNSE	
Stejnefibrase 2 [V. stejnegeri]	FGAHSKLLNEDEQTRNPKEKFCIPNKKNDVLDKDIMLIKLDSPVSNSE	
Contortrixobin [A. c. contortrix]	FGAHSKLLNEDEQTRNPKEKFCIPNKKNDVLDKDIMLIKLDSPVSNSE	
SP1 [Trimeresurus gramineus]	FGAHSKVLNEDEQTRNPKEKFCIPNKKNDVLDKDIMLIKLDSPVSNSE	
Dav-PA [Deinagkistrodon acutus]	LGVHSEKVLNEDEQTRNPKEKFCIPNKKNDVLDKDIMLIKLDSPVSNSE	
	: * *::*** * : ..****:****:****:.*:::	
	101	150
BpirSP27 [Bothrops pirajai]	HIAPLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGSITPIEKTNPDPVPHCANINLLDDAVC	
HS114 [Bothrops jararaca]	HIAPLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGSITPIEKTNPDPVPHCANINLLDDAVC	
SP4 [Crotalus adamanteus]	HIAPLSLPSSPPSVGSVCHIMGWGSITPIEKTLPDPVPHCANINLLDDAVC	
Catroxase II [Crotalus atrox]	HIAPLSLPSSPPSVGSVCHIMGWGSITPIEKTLPDPVPHCANINLLDDAVC	
Defibrase [Gloydius ussuriensis]	HIAPLSLPSSPPSVGSVCHIMGWGSITPIEKTLPDPVPHCANINLLDDAVC	
TLE [A. piscivorus leucostoma]	HIAPLSLPSSPPSVGSVCHIMGWGSITPIEKTLPDPVPHCANINLLDDAVC	
Stejnefibrase 2 [V. stejnegeri]	HIAPLSLPSSPPSVGSVCHIMGWGSITPIEKTLPDPVPHCANINLLDDAVC	
Contortrixobin [A. c. contortrix]	HIAPLSLPSSPPSVGSVCHIMGWGSITPIEKTLPDPVPHCANINLLDDAVC	
SP1 [Trimeresurus gramineus]	HIAPLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGSITPTKVTYDPVPHCANINLLDDAVC	
Dav-PA [Deinagkistrodon acutus]	HIAPLSLPSSPPSVGSVCRIMGWGSITPTKVTYDPVPHCANINLLDDAVC	
	***** *::**** * * ****:*** *:::	
	151	200
BpirSP27 [Bothrops pirajai]	RAAYPELPAEYRT-----RAAYPELPAEYRT-----	
HS114 [Bothrops jararaca]	RAAYPELPAEYRTLCAAGVPEGGIDTCNGDSGGPLICNGQFQGIVFYGAHP	
SP4 [Crotalus adamanteus]	RPPYELPATSRRTLCAAGILEGGKDTCCVDSGGPLICNGQFQGIVFYGAHP	
Catroxase II [Crotalus atrox]	QPPYELPATSRRTLCAAGILEGGKDTCCGDSGGPLICNGQFQGIVFYGAHP	
Defibrase [Gloydius ussuriensis]	QAGYPELLAEYRTLCAAGILEGGKDTCCGDSGGPLICNGQFQGIVFYGAHP	
TLE [A. piscivorus leucostoma]	QAGYPELLVEYRTLCAAGILEGGKDTCCGDSGGPLICNGQFQGIVFYGAHP	
Stejnefibrase 2 [V. stejnegeri]	KPGYPELLPEYRTLCAAGILEGGKDTCCGDSGGPLICNGQFQGIVFYGAHP	
Contortrixobin [A. c. contortrix]	QPGYPELLPEYRTLCAAGILEGGKDTCCGDSGGPLICNGQFQGIVFYGAHP	
SP1 [Trimeresurus gramineus]	KPGYPELLPEYRTLCAAGIVQGGKDTCCGDSGGPLICNGQFQGIVFYGAHP	
Dav-PA [Deinagkistrodon acutus]	QAGYPELLAEYRTLCAAGIVQGGKDTCCGDSGGPLICNGQFQGIVFYGAHP	
	:. ***: *	
	201	234
BpirSP27 [Bothrops pirajai]	-----	Identidade (%)
HS114 [Bothrops jararaca]	CGQAPKPGLYTKVIDYNTWIESVIAGNTAATCPP	99
SP4 [Crotalus adamanteus]	CQALKPGVYTKVFDYNDWISIIAGNTAATCPP	85
Catroxase II [Crotalus atrox]	CGQALKPGVYTKVFDYNDWISIIAGNTAATCPP	84
Defibrase [Gloydius ussuriensis]	CGQSLKPGIYTKVFDYSDWISIIAGNTDASCPP	83
TLE [A. piscivorus leucostoma]	CGQGLMPGVYTKVFDYNDWISIIAGNTAATCPP	82
Stejnefibrase 2 [V. stejnegeri]	CGQSLKPGIYTKVFDYNDWISIIAGNTAATCPP	82
Contortrixobin [A. c. contortrix]	CGQSLKPGIYTKVFDYNDWISIIAGNTAATCPP	80
SP1 [Trimeresurus gramineus]	CGQSLKPGIYTVFDYNDWISIIAGNTAATCPP	80
Dav-PA [Deinagkistrodon acutus]	CGQGPKEIYTNVFDYTDWISIIAGNTDATCPP	76

Figura 10. Alinhamento múltiplo da sequência parcial de aminoácidos da BpirSP27 com sequências de outras serinoproteases de peçonhas de serpentes. Os resíduos de aminoácidos em destaque fazem parte de pontes dissulfeto (**amarelo**), do sítio catalítico (**vermelho**) ou dos sítios de reconhecimento de substratos (**azul**). Os trechos das sequências em **cinza escuro** (N-X-S/T, onde X é qualquer aminoácido exceto a prolina) podem corresponder a sítios de N-glicosilação. Identificadores de sequência no NCBI (*GI numbers*) das enzimas (respectivamente, de cima para baixo, sem considerar a BpirSP27): 82233395, 338855338, 82244345, 82094948, 321172845, 82242792, 32469800, 13959617 e 13959649.

	1	50
BpirSP41 [Bothrops pirajai]	VVGGDECDINEHPFLAFLY-SHG YFCGLTTLNQEWVLTAAHCDRRFMRIY	
SP [Bothrops insularis]	VVGGDECDINEHPFLAFLY-SHG YFCGLTTLNQEWVLTAAHCDRRFMRIY	
Bothrombin [Bothrops jararaca]	VIGGDECDINEHPFLAFMYSPQYFCGMLTLNQEWVLTAAHCDKTYMRIY	
Batroxobin [Bothrops atrox]	VIGGDECDINEHPFLAFMYSPRYFCGMLTLNQEWVLTAAHCDNRRFMRIH	
HS112 [Bothrops jararaca]	VIGGDECDINEHRFLAFLYAG-GYYCGGTTLNQEWVLSAAHCDKRIIRIY	
BthaTL [Bothrops alternatus]	VIGGDECDINEHRFLAFLYPG-RFFCSGTTLNQEWVLTVAHCDTISMRIY	
Leucurobin [Bothrops leucurus]	VIGGDECDINEHPFLAFMYSPRYFCGMLTLNQEWVLTAAHCDNRRFMRI-	
BjussuSP-I [Bothrops jararacussu]	VLGGDECDINEHPFLAFLY-SHG YFCGLTTLNQEWVLTAAHCDSTNFMQ	
Salmonase [G. b. brevicaudus]	VIGGDECDINEHRFLALLY-SERFQCGGTLINEEWVLTAAHCDMRNMYIY	
Protac [A. c. contortrix]	VIGGDECDINEHRFLALVY-ANGSLCGGTTLNQEWVLTARHCDRGNMRIY	
	*:*****:**** *:***:*	*. ****:***:.. **: : :
	51	100
BpirSP41 [Bothrops pirajai]	LGIHTRSVANDDEVIRYPKEK-----VSNST	
SP [Bothrops insularis]	LGIHTRSVANDDEVIRYPKEKFCPNKNMSDEKDKDMLIRLNRPVKNST	
Bothrombin [Bothrops jararaca]	LGIHTRSVANDDEVIRYPKEKFCPNKKKNVITDKDMLIRLNRPVKNST	
Batroxobin [Bothrops atrox]	LGKHAGSVANYDEVVRYPKKFCPNKKKNVITDKDMLIRLDRPVKNSE	
HS112 [Bothrops jararaca]	LGMHTRSVPNDEEIRYPKEKFCPNKKKNVITHKDMLIRLNRPVKNSE	
BthaTL [Bothrops alternatus]	LGHLTRSVPNDEEIRYPMEKFKCPNKRKRSYIKDKDMLIRLNRPVNDSP	
Leucurobin [Bothrops leucurus]	---HAGSVANYDEVVR-----FICPNKKKNVITDKDMLIRLDRPVKNSE	
BjussuSP-I [Bothrops jararacussu]	LGVHSHKVLNDEQTRNPKEKFCPNKNMSEVLDKIDMLIKLDKPISSK	
Salmonase [G. b. brevicaudus]	LGVMHNSVQYDDEQRRYPKKKYFCLSSRNYNQWDKDMLIRLNRPLRNSA	
Protac [A. c. contortrix]	LGMHNLKVLNKLRRFPKEKYFCLNTRNDTIWDKDMLIRLNRPVNRSA	
	* . * * *	: : *
	101	150
BpirSP41 [Bothrops pirajai]	HIAPISLPSNPPSVGSGVCRIMGWGTISPTK-----	
SP [Bothrops insularis]	HIAPISLPSNPPSVGSGVCRVMGWGSITIPNDTYPDVPHCANINLVNDTVC	
Bothrombin [Bothrops jararaca]	HIAPISLPSNPPSVGSGVCRIMGWGAITTS EDTYPDVPHCANINLFNNTVC	
Batroxobin [Bothrops atrox]	HIAPLSLPSNPPSVGSGVCRIMGWGAITTS EDTYPDVPHCANINLFNNTVC	
HS112 [Bothrops jararaca]	HIAPLSLPSNPPSVGSGVCRIMGWGSITTPDETSPNVPHCANINLFNNTVC	
BthaTL [Bothrops alternatus]	HIAPLSLPSNPPSVGSGVCHVMGWGTTSPSKATYPDVPHCANINLVNDTMC	
Leucurobin [Bothrops leucurus]	HIAPLSLPSNPPSVGSGVCRIMGWGAITTS EDTYPDVPHCANINLFNNTVC	
BjussuSP-I [Bothrops jararacussu]	HIAPLSLPSNPPSVGSGVCRIMGWGSITIPNETYPDPVPCANINLVDEYVC	
Salmonase [G. b. brevicaudus]	HIAPLSLPSNPPSVGSGVCRIMGWGTITSPQVTFPDVLHCANINIFDYEV	
Protac [A. c. contortrix]	HIAPLSLPSNPPSVGSGVCRIMGWGTITSPNATLPDVPHCANINILDYAVC	
	*****:*****:****: :	
	151	200
BpirSP41 [Bothrops pirajai]	-----	
SP [Bothrops insularis]	RGAYKRFPKASRTLCAGVLQGGKDTCVGDSGGPLICNGTFQGIVSWGKGV	
Bothrombin [Bothrops jararaca]	REAYNGLPAKT--LCAGVLQGGIDTCGGDSGGPLICNGQFQGILSWGSDP	
Batroxobin [Bothrops atrox]	REAYNGLPAKT--LCAGVLQGGIDTCGGDSGGPLICNGQFQGILSWGSDP	
HS112 [Bothrops jararaca]	REAYNGLPAKT--LCAGVLQGGIDTCGGDSGGPLICNGQFQGILSWGSDP	
BthaTL [Bothrops alternatus]	HGAYNGLPVTSRKFCAGVLQGGIDTCVGDSSGGPLICNGQFQGIVSWGKGV	
Leucurobin [Bothrops leucurus]	REAYNGLP--AKTLCAGVLQGGIDTCGGDSGGPLICNGQFQGILSWGSDP	
BjussuSP-I [Bothrops jararacussu]	QGAYNGLPAKT-TLCAGVLEGGKDTCVGDSGGPLICNGQFQGIVSYGAHS	
Salmonase [G. b. brevicaudus]	RAAYPELPATRTTLCAGILEGGKDSNGDSSGGPLICNGQFQGIAYWGADT	
Protac [A. c. contortrix]	QAAYKGLAAT--TLCAGILEGGKDTCKGDSGGPLICNGQFQGILSVGGNP	
	201	234
BpirSP41 [Bothrops pirajai]	-----KPALYLK-----WISIIAGNKAACPP	100
SP [Bothrops insularis]	CARPRKPALYTKVFDYLPWISIIAGNKTATCPP	91
Bothrombin [Bothrops jararaca]	CAEPRKPAFYTKVFDYLPWISIIAGNKTATCPP	85
Batroxobin [Bothrops atrox]	CAEPRKPAFYTKVFDYLPWISIIAGNKTATCP-	80
HS112 [Bothrops jararaca]	CAQPRKPAFYTKVFDYLPWISIIAGNKTATCPP	80
BthaTL [Bothrops alternatus]	CARLPRPALYTKVFEYLPWISIIAGNTTATCPL	76
Leucurobin [Bothrops leucurus]	CAEPRKPAFYTKVFDYLPWISIIAGNKTATCP-	75
BjussuSP-I [Bothrops jararacussu]	CGQGPKEGIYTNVFDYTDWIQRNIAGNTDATCPP	73
Salmonase [G. b. brevicaudus]	CAQPREPGLYTKVFDYIDWISIIAGNTAVTCPP	72
Protac [A. c. contortrix]	CAQPRKPGIYTKVFDYTDWISIIISGNTDATCPP	70
	.*:***: *	*** **:*. :.***

Figura 11. Alinhamento múltiplo da sequência parcial de aminoácidos da BpirSP41 com sequências de outras serinoproteases de peçonhas de serpentes. Os resíduos de aminoácidos em destaque fazem parte de pontes dissulfeto (amarelo), do sítio catalítico (vermelho) ou dos sítios de reconhecimento de substratos (azul). Os trechos das sequências em cinza escuro (N-X-S/T, onde X é qualquer aminoácido exceto a prolina) podem corresponder a sítios de N-glicosilação. Identificadores de sequência no NCBI (*GI numbers*) das enzimas (respectivamente, de cima para baixo, sem considerar a BpirSP41): 82244284, 14285806, 114837, 82233396, 82173559, 357580550, 123895619, 82248129 e 461512.

4.6. Atividade fibrinogenolítica

Ambas as serinoproteases de *B. pirajai* mostraram atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, apresentando comportamentos distintos (**Fig. 12**). A BpirSP27 parece degradar preferencialmente a cadeia B β , com menor ação sobre a cadeia A α (**Fig. 12A**), fato evidenciado pela ausência ou diminuição das respectivas bandas na presença de maiores doses da enzima (8 e 16 μ g) e pelo surgimento de bandas de degradação não presentes no controle de fibrinogênio (**Fig. 12A**, linha 1). A BpirSP41 (**Fig. 12B**), por sua vez, foi capaz de promover a formação de produtos de degradação evidentes já na dose de 1 μ g, levando à degradação quase completa das cadeias A α e B β nas doses de 8 e 16 μ g (**Fig. 12B**). Nenhuma das enzimas mostrou ser capaz de degradar a cadeia γ do fibrinogênio.

A BpirSP27 teve sua atividade fibrinogenolítica totalmente inibida na presença dos inibidores de serinoproteases PMSF e benzamidina, não havendo degradação de nenhuma das cadeias do fibrinogênio (**Fig. 12A**, linhas 7 e 8). Em relação à BpirSP41, sua atividade foi claramente inibida pela benzamidina (**Fig. 12B**, linha 8) mas não completamente pelo PMSF, podendo-se observar degradação evidente da cadeia A α (**Fig. 12B**, linha 7).

Figura 12. Atividade fibrinogenolítica das serinoproteases de *B. pirajai*. As enzimas em diferentes doses foram incubadas separadamente com fibrinogênio bovino a 37°C durante 2 h e a atividade foi avaliada em SDS-PAGE a 12%. A atividade na presença de inibidores foi avaliada após incubação prévia das enzimas com PMSF (5 mM) ou benzamidina (5 mM) por 30 min a 37°C. Amostras **(A)** BpirSP27 e **(B)** BpirSP41: 1- Fibrinogênio controle (80 μ g); 2- Fibrinogênio + BpirSP (1 μ g); 3- Fibrinogênio + BpirSP (2 μ g); 4- Fibrinogênio + BpirSP (4 μ g); 5- Fibrinogênio + BpirSP (8 μ g); 6- Fibrinogênio + BpirSP (16 μ g); 7- Fibrinogênio + BpirSP (8 μ g) + PMSF; 8- Fibrinogênio + BpirSP (8 μ g) + Benzamidina; 9- BpirSP (4 μ g).

4.7. Atividade fibrinolítica e trombolítica

Os resultados das atividades fibrinolítica (**Fig. 13A**) e trombolítica (**Fig. 13B**) mostram que a BpirSP41 apresenta maior capacidade de degradar coágulos de fibrina e de sangue *in vitro* do que a BpirSP27. Estas atividades parecem ser dependentes tanto da dose utilizada das enzimas quanto do tempo de reação, já que após 24 h de incubação não foi possível observar formação de halos de lise ou degradação significativa do coágulo sanguíneo para nenhuma das serinoproteases, diferentemente do que pode ser observado para o controle positivo de peçonha de *B. pirajai* e para uma metaloprotease da classe P-I isolada desta mesma peçonha (resultados não mostrados). Tais resultados podem indicar tanto uma menor atividade por parte das serinoproteases sobre estes coágulos quanto a necessidade de um maior tempo de reação para que ocorra a degradação, o que parece ser mais provável já que os resultados após 48 h de incubação foram bastante proeminentes, principalmente para a BpirSP41 (**Fig. 13**).

4.8. Atividade esterásica sobre o TAME

No presente estudo, o substrato artificial TAME foi utilizado para determinar a estabilidade da atividade enzimática das serinoproteases de *B. pirajai* após pré-incubação com diferentes inibidores (**Fig. 14**) ou em diferentes valores de pH (**Fig. 15**) e temperaturas (**Fig. 16**).

Na figura **14**, pode-se observar que a atividade da BpirSP27 e BpirSP41 sobre o TAME foi significativamente reduzida na presença de inibidores específicos de serinoproteases (PMSF, benzamidina, leupeptina e aprotinina), enquanto que os inibidores de metaloproteases EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina não foram capazes de promover mudanças significativas nas atividades. Apesar do pré-tratamento com os agentes desnaturantes β -mercaptoetanol e DTT ter resultado em certa diminuição na atividade de ambas as enzimas, apenas o valor para o DTT da BpirSP27 mostrou ser significativamente diferente ($p < 0,05$) em comparação ao controle da enzima na ausência de inibidores.

Os resultados para variações de pH (**Fig. 15**) mostram que, no geral, a atividade enzimática das serinoproteases é maior na faixa de pH entre 6,0 e 10,5, com valores significativamente menores apenas para o pH 3,0. A BpirSP27 (**Fig. 15A**) parece ser mais sensível a pHs mais ácidos (pH 3,0 e 4,5), enquanto que a BpirSP41 (**Fig. 15B**) apresentou pouca variação de atividade na faixa de pHs entre 4,5 e 10,5.

Em relação às variações de temperatura (**Fig. 16**), as atividades das duas enzimas mostraram ser bastante estáveis após incubação em temperaturas variando de 4 a 60°C. Após exposição à temperatura extrema de 100°C, ambas as enzimas apresentaram redução significativa da atividade em relação às outras temperaturas avaliadas. Além disso, ambas as serinoproteases em solução aquosa mostraram-se resistentes a repetidos ciclos de congelamento a -20°C e descongelamento para utilização nos experimentos (resultados não mostrados).

Figura 14. Influência de inibidores na atividade esterásica das serinoproteases de *B. pirajai* sobre o TAME. (A) BpirSP27 e (B) BpirSP41. As enzimas (5 µg) foram previamente incubadas com diferentes inibidores (1 mM) por 30 min a 37°C e em seguida, colocadas para reagir com TAME (1 mM, concentração final) por 30 min a 37°C. O controle positivo corresponde à atividade das enzimas a 37°C e pH 8,1 na ausência de inibidores. Os resultados foram obtidos a 247 nm e expressos pela média $\pm$ SD (n=3) da atividade específica, referente a unidades de TAME por miligrama de proteína (U/mg). (*) Valores significativamente diferentes do controle positivo ($p < 0,05$).

Figura 15. Influência do pH na atividade esterásica das serinoproteases de *B. pirajai* sobre o TAME. (A) BpirSP27 e (B) BpirSP41. As enzimas (5 µg) foram previamente incubadas com diferentes tampões de pH por 30 min a 37°C e em seguida, colocadas para reagir com TAME (1 mM, concentração final) por 30 min a 37°C. Os resultados foram obtidos a 247 nm e expressos pela média $\pm$ SD (n=3) da atividade específica, referente a unidades de TAME por miligrama de proteína (U/mg). (*) Valores significativamente diferentes dos demais grupos ($p < 0,05$).

Figura 16. Influência da temperatura na atividade esterásica das serinoproteases de *B. pirajai* sobre o TAME. (A) BpirSP27 e (B) BpirSP41. As enzimas (5 µg) foram previamente incubadas em diferentes temperaturas (4, 25, 37, 45, 60 e 100°C) por 30 min a 37°C e em seguida, colocadas para reagir com TAME (1 mM, concentração final) por 30 min a 37°C. Os resultados foram obtidos a 247 nm e expressos pela média $\pm$ SD (n=3) da atividade específica, referente a unidades de TAME por miligrama de proteína (U/mg). (*) Valores significativamente diferentes dos demais grupos (p<0,05).

4.9. Atividade pró-coagulante

Como as enzimas de interesse do presente estudo pertencem à classe das serinoproteases, o substrato inicialmente utilizado foi o S-2238, que avalia a capacidade das enzimas em hidrolisar substratos de forma semelhante à trombina. Os resultados mostram que ambas as serinoproteases de *B. pirajai* hidrolisaram o substrato S-2238 de forma dependente da concentração, com valores ligeiramente superiores para a BpirSP41 (**Fig. 17A**).

Após pré-incubação com os inibidores PMSF e benzamidina, pode-se verificar redução significativa na atividade de ambas as enzimas sobre o substrato S-2238, enquanto que com o EDTA o mesmo não foi observado. Pode-se notar também que o PMSF apresentou menor inibição sobre a atividade da BpirSP41 do que sobre a da BpirSP27 (**Fig. 17B**). O íon Cu^{2+} inibiu quase completamente a atividade de ambas as enzimas, sendo a atividade da BpirSP27 também diminuída significativamente na presença do íon Mn^{2+} . Por outro lado, outros íons como Ba^{2+} e

Ca^{2+} não influenciaram de forma significativa a atividade de nenhuma das serinoproteases (**Fig. 17B**).

Os resultados para os demais substratos avaliados mostraram diferentes graus de ação das serinoproteases, ambas sendo capazes de promover hidrólise dos substratos S-2222 (para fator Xa), S-2266 (para calicreína glandular e fator XIa) e S-2302 (para calicreína plasmática, fator XIa e XIIa) dependendo da concentração utilizada (**Fig. 18A, B e C**). Em relação ao substrato S-2251 (para plasmina) (**Fig. 18D**), pode-se observar uma diferença interessante entre as serinoproteases de *B. pirajai*, sendo a BpirSP27 capaz de promover hidrólise dependente da concentração enquanto que a BpirSP41 nas mesmas condições não foi capaz de hidrolisar o substrato.

Figura 17. (A) Efeitos da concentração das serinoproteases de *B. pirajai* na hidrólise do substrato cromogênico S-2238 (para enzimas trombina-símile). A atividade sobre S-2238 (0,4 mM, concentração final) foi determinada pela absorbância a 405 nm após 10 min de reação a 37°C. Os valores de absorbância referentes apenas ao substrato foram subtraídos dos resultados obtidos, expressos pela média $\pm$ SD (n=3). **(B) Efeitos de cátions metálicos e inibidores na atividade hidrolítica das serinoproteases de *B. pirajai* sobre o substrato S-2238.** As enzimas (20 µg/mL) foram pré-incubadas por 30 min a 37°C com os íons Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} ou com os inibidores EDTA (10 mM), PMSF (1 mM) e benzamidina (5 mM). Em seguida, a reação foi iniciada pela adição de S-2238 (0,4 mM, concentração final) e a absorbância foi monitorada a 405 nm por 10 minutos. Os resultados, expressos em porcentagem de atividade, representam a média $\pm$ SD (n=3). (*) Valores significativamente diferentes do controle de atividade (considerado como 100%) (p<0,05).

Figura 18. Efeitos da concentração das serinoproteases de *B. pirajai* na hidrólise dos substratos cromogênicos (A) S-2222 (para fator Xa), (B) S-2266 (para calicreína glandular e fator XIa), (C) S-2302 (para calicreína plasmática, fator XIa e XIIa) e (D) S-2251 (para plasmina). A hidrólise dos substratos (0,4 mM, concentração final) foi determinada pela absorbância a 405 nm após 10 min de reação a 37°C. Os valores de absorbância referentes apenas aos substratos foram subtraídos dos resultados obtidos, expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

4.10. Atividade coagulante sobre plasma

As serinoproteases de *B. pirajai* também foram avaliadas quanto à atividade coagulante, mostrando uma diminuição no tempo de coagulação do plasma humano na presença de doses crescentes das enzimas (**Fig. 19**). A BpirSP41 mostrou maior potencial coagulante, com dose coagulante mínima (DCM), ou seja, a dose capaz de coagular o plasma em 60 segundos, estimada em aproximadamente 3,5 µg (**Fig. 19B**), enquanto que a DCM para a BpirSP27 foi bem maior, de aproximadamente 20 µg (**Fig. 19A**).

Esta maior atividade coagulante por parte da BpirSP41 fica ainda mais evidente quando as cinéticas da coagulação promovida por ambas as enzimas são comparadas (**Fig. 20**). Considerando que a curva cinética da coagulação atinge seu platô por volta do valor 0,8 de absorbância, o tempo necessário para cada uma das enzimas causar aumento de 0,4 na absorbância (metade do valor do platô) é de aproximadamente 3 minutos para a BpirSP41 e 17 minutos para a BpirSP27 (**Fig. 20**).

A ação de inibidores de serinoproteases sobre a atividade coagulante das enzimas BpirSP27 e BpirSP41 é mostrada na figura **21**. Enquanto que a benzamidina e a leupeptina causam inibição quase que completa durante todo o período de reação avaliado, a inibição por PMSF mostrou ser menos eficiente para as duas enzimas, especialmente contra a atividade da BpirSP41 (**Fig. 21B**). Estes dados corroboram os demais já apresentados, confirmando que o PMSF parece ser menos efetivo em inibir a BpirSP41 do que a BpirSP27.

A cinética de coagulação também foi avaliada para as enzimas deglicosiladas com PNGase F e mostrou que nas doses de 1 e 5 µg, nenhuma das serinoproteases deglicosiladas foi capaz de causar qualquer coagulação do plasma humano durante o tempo de reação avaliado (**Fig. 22**), sugerindo uma grande importância dos carboidratos N-ligados para a atividade destas enzimas.

Figura 19. Atividade coagulante dose-resposta das serinoproteases BpirSP27 (A) e BpirSP41 (B) sobre o plasma humano. A atividade coagulante foi avaliada usando plasma humano a 37°C e diferentes doses das enzimas, sendo o tempo de coagulação caracterizado pelo aparecimento de rede de fibrina ou formação imediata do coágulo. A dose coagulante mínima (DCM) foi considerada como a quantidade de enzima capaz de coagular o plasma em 60 segundos (THEAKSTON; REID, 1983). Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

Figura 20. Comparação da cinética de coagulação das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41. O ensaio cinético foi realizado em microleitor usando plasma humano a 37°C e as enzimas (1 µg), monitorando a absorbância a 405 nm por 30 minutos. Dos resultados obtidos para cada minuto de reação foram subtraídos os valores de absorbância para o controle de plasma na ausência das enzimas. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

Figura 21. Cinética de coagulação das serinoproteases BpirSP27 (A) e BpirSP41 (B) na presença de inibidores específicos. As enzimas foram pré-incubadas com os inibidores PMSF, benzamidina ou leupeptina (5 mM) por 30 min a 37°C. O ensaio cinético foi então realizado em microleitor usando plasma humano a 37°C e as enzimas (1 µg) pré-tratadas ou não com os inibidores, monitorando a absorbância a 405 nm por 30 minutos. Dos resultados obtidos para cada minuto de reação foram subtraídos os valores de absorbância para o controle de plasma na ausência das enzimas. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

Figura 22. Cinética de coagulação das serinoproteases BpirSP27 (A) e BpirSP41 (B) após deglicosilação com PNGase F. As enzimas foram previamente deglicosiladas com PNGase F de acordo com especificações do fabricante (New England BioLabs) por 24 h a 37°C. O ensaio cinético foi então realizado em microleitor usando plasma humano a 37°C e as enzimas deglicosiladas (1 e 5 µg), monitorando a absorbância a 405 nm por 30 minutos. Dos resultados obtidos para cada minuto de reação foram subtraídos os valores de absorbância para o controle de plasma na ausência das enzimas. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

4.11. Efeitos sobre plaquetas

As enzimas BpirSP27 e BpirSP41 foram capazes de promover agregação em plaquetas lavadas, na presença ou ausência de cálcio no meio reacional (**Fig. 23**). Estimando pelo gráfico da figura **23A**, a BpirSP27 seria capaz de causar 50% de agregação plaquetária na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a agregação induzida pela BpirSP41 se estabilizou em torno de 20%, independente do aumento de sua concentração (**Fig. 23B**).

Figura 23. Efeitos das serinoproteases BpirSP27 (A) e BpirSP41 (B) sobre plaquetas lavadas. Os ensaios foram realizados a 37°C utilizando-se 300 μL de plaquetas lavadas (WP) com ou sem acréscimo de CaCl_2 (2 mM, concentração final). As enzimas foram adicionadas diretamente sobre o WP, em concentrações entre 16 e 115 $\mu\text{g/mL}$, e a agregação plaquetária foi então monitorada. A porcentagem de agregação foi determinada 6 minutos após a adição das enzimas. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

4.12. Efeitos sobre o sistema complemento

As serinoproteases de *B. pirajai* não foram capazes de promover hemólise direta de hemácias de coelho ou carneiro (resultados não mostrados), possibilitando o uso do método hemolítico cinético para a determinação de seus efeitos sobre o sistema complemento humano. Além disso, a dosagem de endotoxinas bacterianas nas amostras mostrou valores abaixo de 0,1 EU/mL (resultados não mostrados), excluindo a possibilidade de que os efeitos observados sobre o sistema complemento pudessem estar relacionados à presença destas endotoxinas.

Após incubação das enzimas com o SHN por 1 h a 37°C, a atividade hemolítica promovida pelas VC/VL do sistema complemento mostrou ser reduzida significativamente em relação ao controle sem as serinoproteases, como mostrado pelos valores de $t_{1/2}$ (**Fig. 24**). Tanto a BpirSP27 (**Fig. 24A**) quanto a BpirSP41 (**Fig. 24B**) induziram aumento significativo do $t_{1/2}$ ($p < 0,05$) em todas as concentrações avaliadas, indicando modulação do complemento por ambas as enzimas. Estas inibições ficam ainda mais evidentes analisando as curvas de porcentagem de inibição das VC/VL, que mostram que a BpirSP41 promoveu maior inibição do que a BpirSP27 (**Fig. 25**). Por estas mesmas curvas foi possível estimar a concentração das enzimas que inibiriam 50% da hemólise (IC₅₀), obtendo-se um valor bastante superior para a BpirSP27 (IC₅₀ ~1096,1 µg/mL) em relação à BpirSP41 (IC₅₀ ~271,5 µg/mL) e confirmando o maior potencial de inibição da BpirSP41 sobre as VC/VL do sistema complemento. Embora as concentrações capazes de induzir 50% de hemólise não tenham sido testadas experimentalmente, a estimativa da IC₅₀ das duas enzimas foi determinada para fins comparativos considerando a alta linearidade obtida (R^2) nos gráficos de porcentagem de inibição (**Fig. 25**).

Em relação à inibição da atividade hemolítica promovida pela VA, pode-se observar que as serinoproteases de *B. pirajai* promoveram aumentos significativos do $t_{1/2}$ em todas as concentrações avaliadas, com exceção da concentração de 25 µg/mL para a BpirSP41 (**Fig. 26**). Estes efeitos observados foram menos pronunciados em comparação à modulação das VC/VL, como fica claro pelos gráficos de porcentagem de inibição (**Fig. 27**). Devido à baixa linearidade destes gráficos, não foi possível estimar a IC₅₀ das serinoproteases sobre a VA, porém, é possível observar que ambas apresentaram inibição ao redor de 20% para a concentração de 200 µg/mL.

Figura 24. Efeitos das serinoproteases BpirSP27 (A) e BpirSP41 (B) sobre a atividade hemolítica das vias clássica/das lectinas do sistema complemento humano. $t_{1/2}$ representa o tempo necessário (em segundos) para que ocorra lise de 50% das hemácias pelo sistema complemento. O controle representa a atividade hemolítica do SHN incubado apenas com tampão. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3). (*) Valores significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Figura 25. Porcentagens de inibição da atividade hemolítica das vias clássica/das lectinas (VC/VL) do sistema complemento humano em função de concentrações crescentes das serinoproteases BpirSP27 (A) e BpirSP41 (B). As equações de reta foram obtidas por regressão linear e utilizadas para estimar a concentração das enzimas que seria capaz de inibir 50% da hemólise (IC₅₀). Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

Figura 26. Efeitos das serinoproteases BpirSP27 (A) e BpirSP41 (B) sobre a atividade hemolítica da via alternativa do sistema complemento humano. $t_{1/2}$ representa o tempo necessário (em segundos) para que ocorra lise de 50% das hemácias pelo sistema complemento. O controle representa a atividade hemolítica do SHN incubado apenas com tampão. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3). (*) Valores significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Figura 27. Porcentagens de inibição da atividade hemolítica da via alternativa (VA) do sistema complemento humano em função de concentrações crescentes das serinoproteases BpirSP27 (A) e BpirSP41 (B). As equações de reta foram obtidas por regressão linear. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

4.13. Efeitos pró-inflamatórios

Os resultados obtidos sugerem que as serinoproteases de *B. pirajai* apresentam pequena participação nos processos inflamatórios de edema (**Fig. 28**) e dor (**Fig. 29**) em ratos. Em relação à atividade edematogênica, a BpirSP27 mostrou comportamento dependente da dose, embora o aumento do volume da pata injetada com esta enzima não tenha ultrapassado os 14% na maior dose avaliada (50 µg) (**Fig. 28A**). Além disso, todas as doses apresentaram um perfil edematogênico similar, com aumento significativo após 1 h da injeção da enzima e outro pico de edema após 4 h, principalmente para a dose de 50 µg (**Fig. 28A**). No caso da BpirSP41, o perfil edematogênico das doses testadas foi mais variável (**Fig. 28B**), com as doses de 25 e 50 µg apresentando respostas bastante similares, com pico de edema significativo ($p < 0,05$) 4 h após a injeção da enzima, e a dose de 10 µg com um perfil sem picos de edema pronunciados. Similarmente à BpirSP27, a BpirSP41 não foi capaz de induzir edema superior a aproximadamente 12% nas doses avaliadas (**Fig. 28B**). Estes valores de edema são bastante discretos quando comparados com aqueles obtidos para uma metaloprotease da classe P-I também isolada da peçonha de *B. pirajai*, a qual induziu edema superior a 30% na dose de 50 µg em todos os tempos avaliados (1 a 6 h), com pico de resposta de aproximadamente 70% após 2 h de sua injeção (resultados não mostrados).

A diminuição do limiar nociceptivo também foi bastante discreta para as duas serinoproteases de *B. pirajai*, com poucos valores significativamente diferentes dos limiares iniciais ($p < 0,05$) e não ultrapassando os 15% (**Fig. 29**). Além disso, os perfis nociceptivos induzidos pelas diferentes doses das enzimas BpirSP27 e BpirSP41 foram bastante variáveis, não sendo observado um efeito dose-dependente evidente. Na dose de 50 µg, a BpirSP27 induziu um pico de dor 3 h após sua injeção (**Fig. 29A**), enquanto que a BpirSP41 na mesma dose induziu um perfil bastante distinto, com pico acentuado 1 h após sua injeção e novamente após 4 h (**Fig. 29B**). De forma similar ao observado para a indução de edema, a metaloprotease da classe P-I de *B. pirajai* parece estar mais relacionada ao processo de nocicepção do que as serinoproteases, apresentando diminuição de mais de 30% do limiar de dor para a dose de 50 µg após 3 h de sua injeção (resultados não mostrados).

A avaliação dos exsudatos inflamatórios peritoneais induzidos 6 ou 24 h após administração de diferentes doses das serinoproteases BpirSP27 e BpirSP41 (**Fig. 30**) mostrou que as enzimas promoveram aumentos discretos na quantidade de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos nas maiores doses avaliadas (50 e 100 µg), porém, nenhum destes valores foi significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (PBS). Comparativamente, quando 25 µg da peçonha bruta de *B. pirajai* são injetados na cavidade peritoneal de camundongos, o número total de leucócitos presentes no exsudato inflamatório quase dobra em relação aos valores do controle negativo (resultados não mostrados).

Além disso, a diferenciação dos leucócitos presentes nestes exsudatos em neutrófilos ou células mononucleares (linfócitos ou monócitos) (**Fig. 31**) revelou que, 6 h após a administração, ambas as serinoproteases promoveram aumentos significativos ($p < 0,05$) no número de neutrófilos em relação ao controle negativo (**Fig. 31A**). Depois de 24 h, esta quantidade de neutrófilos permaneceu significativamente mais elevada do que o controle negativo para todas as doses avaliadas da BpirSP41 e apenas para a dose de 100 µg da BpirSP27 (**Fig. 31B**), contudo, estes aumentos foram menores do que os observados após 6 h da administração das enzimas.

Figura 28. Atividade edematogênica induzida pelas serinoproteases BpirSP27 (A) e BpirSP41 (B). A indução de edema foi avaliada pelo aumento do volume da pata de ratos em diferentes tempos (1 a 6 h) após a injeção de solução salina (controle negativo, pata direita) ou de diferentes doses das enzimas (10, 25 e 50 µg, pata esquerda). Os resultados foram calculados pela diferença entre os volumes obtidos para ambas as patas e expressos pela média $\pm$ SD (n=4) em porcentagem de aumento do volume da pata em relação às medidas iniciais. (*) Aumentos significativamente diferentes das medidas iniciais ($p < 0,05$).

Figura 29. Avaliação da hiperalgesia induzida pelas serinoproteases BpirSP27 (A) e BpirSP41 (B). O limiar de dor foi avaliado pela flexão da pata de ratos frente à pressão exercida em diferentes tempos (1 a 6 h) após a injeção de solução salina (controle negativo, pata direita) ou de diferentes doses das enzimas (10, 25 e 50 µg, pata esquerda). Os resultados foram calculados pela diferença entre os valores obtidos para ambas as patas e expressos pela média $\pm$ SD (n=4) em porcentagem de decréscimo do limiar nociceptivo em relação ao limiar inicial. (*) Valores significativamente diferentes do limiar inicial ($p < 0,05$).

Figura 30. Contagem total dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após 6 horas (A) e 24 horas (B) da administração das serinoproteases de *B. pirajai*. A contagem do número total de leucócitos presentes no lavado peritoneal após injeção de PBS (controle negativo) ou diferentes doses das enzimas (25, 50 e 100 µg em 500 µL de PBS) foi feita em câmara de Neubauer. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3). Nenhum dos valores foi significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Figura 31. Contagem diferencial dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos após 6 horas (A) e 24 horas (B) da administração das serinoproteases de *B. pirajai*. A contagem diferencial (neutrófilos e células mononucleares) dos leucócitos do exsudato inflamatório induzido por PBS (controle negativo) ou diferentes doses das enzimas (25, 50 e 100 µg) foi feita em microscópio óptico, magnificação 400X. Resultados expressos pela porcentagem média de cada tipo celular $\pm$ SD (n=3). (*) Variações significativas em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As serinoproteases de interesse ao presente trabalho foram isoladas da peçonha bruta de *B. pirajai* por três etapas cromatográficas consecutivas: exclusão molecular em Sephacryl S-200, afinidade em Benzamidine Sepharose e fase reversa em HPLC usando coluna C2/C18 (**Fig. 4**). Apesar das enzimas BpirSP27 e BpirSP41 terem sido obtidas com elevado grau de pureza após o fracionamento cromatográfico, o rendimento do processo para a obtenção de ambas pode ser considerado baixo (aproximadamente 0,5% da massa total de peçonha bruta para cada serinoprotease), sendo necessária a repetição de todo o processo de isolamento por diversas vezes.

Vários estudos publicados mostram o isolamento de serinoproteases de peçonhas de serpentes pela combinação de diferentes técnicas cromatográficas rápidas e eficientes, sendo que a maioria dos procedimentos se inicia com uma separação baseada no tamanho molecular seguida por cromatografia de troca-iônica ou de afinidade (SERRANO; MAROUN, 2005).

Zaganelli e colaboradores (1996) isolaram uma serinoprotease da peçonha de *Bothrops jararacussu* pela combinação de três processos cromatográficos em Sephadex G-100, DEAE-5PW-PAK e Sephacryl S-200. Magalhães e colaboradores (2007) também usaram três processos cromatográficos (Sephacryl S-200, Sepharose-aggmatine e DEAE-Sepharose CL-6B) para isolar a serinoprotease leucurobin da peçonha do *B. leucurus*. Vieira e colaboradores (2004) isolaram uma enzima trombina-símile da peçonha de *B. jararaca* utilizando uma única etapa de purificação em Benzamidine Sepharose, enquanto que Sant'Ana e colaboradores (2008a) isolaram a enzima BjussuSP-I de *B. jararacussu* associando Sephadex G-75 e Benzamidine Sepharose. Costa e colaboradores (2009) isolaram uma enzima trombina-símile da peçonha de *B. pauloensis* por meio de uma etapa de troca iônica em CM-Sepharose seguida de uma cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose CL-4B. Outro exemplo é o isolamento da enzima bhalternin da peçonha de *B. alternatus* pela combinação de cromatografias de troca iônica, exclusão molecular e afinidade (DEAE-Sepharose, Sephadex G-75 e Benzamidine Sepharose, respectivamente) (COSTA et al., 2010).

Embora menos frequente, o uso de HPLC em fase reversa também é descrito na literatura, tanto como etapa única de isolamento (VILCA-QUISPE et al., 2010) quanto associado a outras etapas cromatográficas (SMOLKA et al., 1998; PONCE-SOTO et al., 2007; VALERIANO-ZAPANA et al., 2012), como no caso do presente trabalho. Cabe ressaltar que é possível que, assim como ocorre com outras classes de enzimas, as serinoproteases percam certo grau de atividade ao serem expostas aos solventes TFA e acetonitrila, provavelmente devido a um pequeno nível de desnaturação das moléculas. Esta perda de atividade, entretanto, não parece ser muito elevada. Serrano e colaboradores (2000), por exemplo, mostraram que as três isoformas de serinoproteases isoladas da peçonha de *B. jararaca* retiveram cerca de 85% de suas atividades coagulantes após aplicação em RP-HPLC.

Sabe-se que a presença de isoformas enzimáticas é bastante comum em peçonhas de serpentes, tanto na mesma peçonha como em peçonhas de espécies diferentes. No caso de serinoproteases, diversos estudos mostram a presença de isoformas destas enzimas em diversas peçonhas de serpentes. Hung e Chiou (1994), por exemplo, isolaram múltiplas isoformas de uma α -fibrinogenase da peçonha de *Crotalus atrox*, sendo todas proteínas de cadeia única e de massas moleculares similares (entre 33 e 35 kDa). Gao e colaboradores (1998) isolaram três isoformas a partir da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri*, com massas moleculares de 50, 32 e 31 kDa, próximas àquelas observadas para as serinoproteases isoladas no presente trabalho. Em 2001, Wang e colaboradores encontraram quatro clones distintos de cDNA na glândula de peçonha de *Deinagkistrodon acutus*: a fibrinogenase acutobin e três outras serinoproteases, denominadas Dav-PA, Dav-KN e Dav-X. Neste mesmo estudo, os autores fizeram uma árvore filogenética baseada na análise das sequências de 40 serinoproteases de 18 espécies da subfamília Crotalinae, separando-as em três subtipos majoritários de enzimas de acordo com a evolução: enzimas coagulantes, cininogenases e ativadoras de plasminogênio (WANG et al., 2001).

O isolamento de diferentes serinoproteases a partir de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* não é algo comumente descrito em um mesmo trabalho, estando os estudos de Serrano e colaboradores (1993; 1998; 2000) e Petretski e colaboradores (2000) entre os poucos encontrados. Serrano e colaboradores (1993) isolaram duas serinoproteases básicas (MSP1 e 2) da

peçonha de *B. moojeni*, com massas moleculares em SDS-PAGE próximas de 34 e 38 kDa e atividades distintas sobre plaquetas e substratos como o TAME. Anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisadores isolou duas isoformas ácidas de serinoproteases da peçonha de *B. jararaca* (KN-BJ1 e KN-BJ2), com massas moleculares próximas de 38 e 39 kDa e sequências N-terminal similares (SERRANO et al., 1998). Ainda desta mesma peçonha, Serrano e colaboradores (2000) obtiveram também outras três isoformas distintas da serinoprotease TL-BJ, com atividades coagulantes e amidolíticas similares e pequenas diferenças em suas massas moleculares em SDS-PAGE (30, 31 e 32 kDa), taxas de N-glicosilação e sequências N-terminal. Já Petretski e colaboradores (2000) isolaram duas isoformas de enzimas trombina-símile da peçonha de *B. atrox* que, embora com pequenas diferenças em suas massas moleculares e de afinidade de ligação a resinas de troca-iônica, apresentaram as mesmas atividades enzimáticas e sequências N-terminal.

Além dos trabalhos descritos acima, diferentes estudos descrevem diferentes serinoproteases provenientes da peçonha de uma mesma espécie de serpente, como por exemplo, *B. jararaca* (MANDELBAUM; HENRIQUES, 1964; NISHIDA et al., 1994; SERRANO et al., 1995, 1998; 2000; VIEIRA et al., 2004) e *B. jararacussu* (ZAGANELLI et al., 1996; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 1997; BORTOLETO et al., 2002; SILVA-JUNIOR et al., 2007; SANT'ANA et al., 2008a). Estas variações na composição das peçonhas de serpentes de uma mesma espécie podem estar relacionadas a diversos fatores, como diferenças de idade, sexo, alimentação e localização dos espécimes dos quais foram obtidas as peçonhas utilizadas nos diferentes estudos (MACKESSY, 2009).

Os relatos de isoformas em uma mesma peçonha estão mais frequentemente relacionados a estudos de proteoma ou transcriptoma, como por exemplo, o de Saguchi e colaboradores (2005), que descreveram o sequenciamento de diversos clones de serinoproteases a partir da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *B. jararaca*. Ohler e colaboradores (2010) mostraram que o proteoma da peçonha de *B. alternatus* apresentava uma grande diversidade de serinoproteases ácidas e com alta homologia a outras enzimas da mesma classe provenientes de diferentes gêneros de serpentes (*Bothrops*, *Gloydius* e *Agkistrodon*). Em outro estudo, Hasson e colaboradores (2010) clonaram sequências de cDNA que codificavam para quatro

isoformas bastante similares de serinoproteases da glândula de peçonha de *Echis ocellatus*.

Segundo a análise do DNA genômico de *Trimeresurus flavoviridis*, os genes da glândula de peçonha que codificam serinoproteases formam uma família multigene, ou seja, provavelmente surgiram por duplicação e variação de um gene ancestral único (DESHIMARU et al., 1996). Sabe-se que serpentes possuem diferentes genes que codificam várias isoformas de diversas enzimas, mas a expressão e a síntese das diferentes isoformas não são bem compreendidas até o momento. Sabe-se também que pequenas alterações na sequência de aminoácidos de isoformas de serinoproteases podem causar grandes diferenças nas atividades destas enzimas (SAGUCHI et al., 2005; SERRANO; MAROUN, 2005).

As massas moleculares das serinoproteases de *B. pirajai* foram determinadas tanto por SDS-PAGE (**Fig. 5**) quanto por espectrometria de massas (MS) (**Fig. 6**), mostrando resultados ligeiramente diferentes: a BpirSP27 apresentou massa molecular estimada em 32 kDa por SDS-PAGE e aproximadamente 27 kDa por MS, enquanto a BpirSP41 teve massa de 49 kDa em SDS-PAGE e de aproximadamente 41 kDa por MS. Sabe-se que proteínas glicosiladas tendem a migrar menos em géis de eletroforese devido à diminuição do número de moléculas de SDS vinculadas ao backbone polipeptídico graças às cadeias laterais oligossacarídicas (SEGREST et al., 1971). Além disso, considerando que a técnica de MS é bem mais precisa do que a de SDS-PAGE, os resultados determinados por MS devem refletir melhor as massas moleculares reais das proteínas estudadas.

A deglicosilação com PNGase F promoveu diminuição nas massas moleculares de ambas as serinoproteases de *B. pirajai* (**Fig. 7**). Esta diminuição deve-se à hidrólise de ligações entre resíduos de asparagina e oligossacarídeos N-ligados (N-glicanas) (TARENTINO et al., 1985). Considerando as reduções das massas moleculares em SDS-PAGE promovidas pelo tratamento com esta enzima deglicosilante, pode-se dizer que aproximadamente 15% e 42% das massas moleculares da BpirSP27 e BpirSP41, respectivamente, correspondem a oligossacarídeos N-ligados. Além disso, de acordo com o que foi observado pelo tratamento com a enzima neuraminidase, é possível dizer que as serinoproteases de *B. pirajai* não apresentam quantidades significativas de moléculas de ácido siálico ligadas em suas estruturas. Vale lembrar que as serinoproteases de peçonhas de

serpentes também podem apresentar sítios de O-glicosilação (SERRANO; MAROUN, 2005; SOARES; OLIVEIRA, 2009), e desta forma, pode ser que as enzimas BpirSP27 e BpirSP41 apresentem conteúdo glicídico ainda maior do que o determinado apenas com o tratamento com PNGase F.

Em relação ao ponto isoelétrico, as duas serinoproteases de *B. pirajai* apresentaram valores de pI ácidos (**Fig. 8**). Assim como a BpirSP27 e a BpirSP41, a maioria das serinoproteases de peçonhas de serpentes já descritas são glicoproteínas de cadeia polipeptídica única e apresentam valor de pI ácido, com massas moleculares bastante variáveis (de 25 a 67 kDa), devido a diferenças no conteúdo de carboidratos de cada enzima (SERRANO; MAROUN, 2005). A jararacussin-I, uma enzima da peçonha de *B. jararacussu*, apresentou Mr de 28.000 e pI 5,0 (BORTOLETO et al., 2002). Zaganelli e colaboradores (1996) isolaram a FC-Bj, uma enzima de cadeia polipeptídica única com Mr superior a 50.000, 19% de carboidratos e pI 3,3-4,4. Ainda desta mesma peçonha, Andrião-Escarso e colaboradores (1997) obtiveram a massa molecular de 37.500 Da e pI 5,2 para a serinoprotease D-V. Já a BjussuSP-I é uma glicoproteína de cadeia polipeptídica única, com massa molecular próxima de 61 kDa e pI ~3,8 (SANT'ANA et al., 2008a). Também do gênero *Bothrops*, a serinoprotease BalII-4 da peçonha de *B. atrox* teve sua massa molecular de 33 kDa determinada por espectrometria de massas e pI 5,0 (PONCE-SOTO et al., 2007), e a BpSP-I da peçonha de *B. pauloensis* é uma glicoproteína que contém carboidratos N-ligados e ácido siálico em sua estrutura, com massa molecular de 34 kDa em condições desnaturantes e pI ~6,4 (COSTA et al., 2009).

Entre as serinoproteases neutras e básicas, com valores de pI superiores a 7,0, estão as enzimas jararassin-I com pI entre 7,4-7,8 (VIEIRA et al., 2004) e a PA-BJ com pI superior a 9,0 (SERRANO et al., 1995), ambas isoladas da peçonha de *B. jararaca*, a MOO3 de *B. moojeni* com pI 7,8 (OLIVEIRA et al., 1999), a calobin II de *Agkistrodon caliginosus* com pI 7,4 (CHO et al., 2001), a cerastocytin de *Cerastes cerastes* com pI superior a 9,0 (MARRAKCHI et al., 1995a) e a okinaxobin II de *Trimeresurus okinavensis* com pI 8,1 (NOSE et al., 1994).

A taxa de glicosilação varia muito de uma serinoprotease para a outra. Estudos de glicosilação da BPA de *B. jararaca*, por exemplo, mostram que aproximadamente 62% de sua alta massa molecular (67 kDa) deve-se ao conteúdo

de carboidratos (MURAYAMA et al., 2003). Em outro estudo, Serrano e colaboradores (2000) mostraram que as três isoformas de serinoproteases isoladas de *B. jararaca* (TL-BJ 1, 2 e 3) diferiam na taxa de N-glicosilação, sendo que duas das enzimas tiveram suas massas moleculares reduzidas de 30 e 31 kDa para 23 kDa após tratamento com PNGase F, enquanto que a massa da terceira isoforma permaneceu inalterada em 32 kDa. Da peçonha de *B. jararacussu*, enquanto algumas serinoproteases isoladas têm taxa de glicosilação ao redor de 5% de suas massas moleculares (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 1997; BORTOLETO et al., 2002), outras apresentam conteúdo glicídico bem maior, como a enzima FC-Bj, com 19% de carboidratos (ZAGANELLI et al., 1996), a BJ-48, com 42% de sua massa de 52 kDa correspondendo a carboidratos N-ligados, incluindo 8-12% de resíduos de ácido siálico (SILVA-JUNIOR et al., 2007), e a BjussuSP-I, que teve sua massa molecular de 61 kDa reduzida a 37 e 45 kDa após deglicosilação com PNGase F e neuraminidase, respectivamente (SANT'ANA et al., 2008a), indicando um conteúdo de N-glicanas ao redor de 39%. Similarmente, a enzima TLBan da peçonha de *B. andrianus* teve sua massa molecular de 29 kDa em SDS-PAGE em condições desnaturantes diminuída para 25 e 22 kDa após tratamento com neuraminidase e PNGase F, respectivamente (VALERIANO-ZAPANA et al., 2012).

Embora inicialmente fosse possível suspeitar-se que as diferenças entre a BpirSP27 e a BpirSP41 estivessem restritas aos seus conteúdos de carboidratos, a determinação de partes de suas sequências de aminoácidos mostrou diferenças consideráveis, com apenas 61% de identidade entre os trechos coincidentes obtidos por sequenciamento (**Fig. 9**).

O alinhamento múltiplo da sequência parcial da BpirSP27 com a de outras serinoproteases de peçonhas de serpentes (**Fig. 10**) mostrou identidade de 99% com a sequência de um clone de cDNA da glândula de peçonha de *B. jararaca* (HS114), sequenciado por Saguchi e colaboradores (2005). Interessantemente, a BpirSP27 mostrou maior homologia sequencial com serinoproteases de peçonhas de outros gêneros de serpentes que não *Bothrops*, entre eles *Crotalus*, *Trimeresurus*, *Gloydius* e *Agkistrodon*. De maneira contrária, a sequência parcial da BpirSP41 apresentou maior similaridade a sequências de serinoproteases de outras espécies do gênero *Bothrops*, incluindo *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. alternatus*, *B.*

jararaca e *B. insularis*, apresentando até 91% de identidade à sequência de uma serinoprotease desta última espécie (**Fig. 11**).

A elevada homologia entre enzimas coagulantes é confirmada pela presença de diversos aminoácidos conservados. A presença de valina como primeiro resíduo da sequência N-terminal, por exemplo, é característica comum na maioria das serinoproteases de peçonhas de serpentes (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 1997; CASTRO et al., 2004), sendo também comum a substituição deste resíduo por um similar, usualmente de isoleucina, como nos casos da bilineobin da peçonha de *Agkistrodon bilineatus* (NIKAI et al., 1995), da KN-BJ de *B. jararaca* (SERRANO et al., 1998) e da stejnefibrase 1 de *Trimeresurus stejnegeri* (GAO et al., 1998).

A comparação das sequências de aminoácidos de enzimas trombina-símile de peçonhas de serpentes com aquelas de serinoproteases clássicas como quimotripsina, tripsina, trombina e calicreína, mostra diferentes graus de identidade, sendo observadas diversas substituições. Assim, as enzimas trombina-símile no geral apresentam baixa homologia sequencial com a quimotripsina (24-31%) e trombina (26-33%), sendo um pouco mais similares à calicreína (34-40%) e tripsina (31-44%). Entre as regiões conservadas podem ser citadas a tríade catalítica formada pelos resíduos de aminoácidos His57, Asp102 e Ser195, e os sítios de reconhecimento de substratos S1 (Asp189) e S2 (Gly216), além de doze resíduos de cisteína que formam seis pontes dissulfeto (usualmente entre os pares 22-157, 42-58, 91-250, 136-201, 168-182 e 191-220) (CASTRO et al., 2004). Esta numeração dos resíduos de aminoácidos usualmente utilizada tem como base a sequência do tripsinogênio e considera os aminoácidos que fazem parte do peptídeo sinal (CASTRO et al., 2004).

Sem as sequências completas da BpirSP27 e da BpirSP41, não é possível verificar se todos estes resíduos de aminoácidos descritos como importantes para as atividades desta classe de enzimas estão de fato conservados nas sequências das serinoproteases de *B. pirajai*. No entanto, de acordo com as numerações usadas nas figuras **10** e **11**, sem considerar o peptídeo sinal de acordo com Itoh e colaboradores (1987), pode-se dizer que na sequência parcial obtida para a BpirSP27 são encontrados seis resíduos de cisteína altamente conservados (nas posições 7, 26, 42, 118, 139 e 150), assim como os resíduos de histidina (41) e ácido aspártico (86) que fazem parte do sítio ativo da enzima. Para a BpirSP41,

foram obtidos cinco resíduos conservados de cisteína (nas posições 7, 26, 42, 118 e 232), além do resíduo de histidina (41) do sítio ativo. Em comparação ao alinhamento múltiplo sequencial apresentado no estudo de Castro e colaboradores (2004), os resíduos de cisteína nas posições 7-139 (para a BpirSP27) e 26-42 (para a BpirSP27 e a BpirSP41) devem formar pontes dissulfeto entre si.

As serinoproteases de peçonhas de serpentes não são consideradas letais isoladamente e seus efeitos tóxicos estão relacionados principalmente às ações destas enzimas sobre o sistema hemostático (BRAUD et al., 2000a). De fato, as serinoproteases de *B. pirajai* demonstraram não serem letais em doses de até 100 µg injetadas na cavidade peritoneal de camundongos, também não apresentando efeito miotóxico sobre o músculo gastrocnêmio destes animais em doses de até 50 µg e sem efeitos citotóxicos significativos sobre culturas de células de baço de camundongos em concentrações de até 100 µg/mL (resultados não mostrados).

Várias serinoproteases de peçonhas de serpentes da família Viperidae convertem fibrinogênio em fibrina pela clivagem e liberação de fibrinopeptídeos A e/ou B (STOCKER et al., 1982; PIRKLE; THEODOR, 1990; PIRKLE, 1998). Os monômeros de fibrina gerados por estas enzimas sofrem polimerização limitada, já que geralmente apenas um fibrinopeptídeo é clivado e não há ativação do fator XIII, que em sua forma ativada (XIIIa) catalisa a união dos monômeros de fibrina (BRAUD et al., 2000a). Embora não seja comum, existem relatos de serinoproteases capazes de ativar o fator XIII, como a cerastocytin da peçonha de *Cerastes cerastes* (MARRAKCHI et al., 1997) e a gabonase de *Bitis gabonica* (PIRKLE et al., 1986).

O fibrinogênio é composto de três pares de cadeias polipeptídicas distintas – as cadeias A α (Mr 66.000), B β (Mr 52.000) e γ (Mr 46.500) – unidas por 29 pontes dissulfeto inter e intra-cadeias, formando uma estrutura com massa molecular relativa de aproximadamente 340.000 (DAVIE et al., 1991). A conversão do fibrinogênio à fibrina pela trombina é feita por proteólise limitada, com clivagem da ligação peptídica entre os resíduos Arg16-Gly17 das duas cadeias A α e entre os resíduos Arg14-Gly15 das duas cadeias B β (BLOMBÄCK et al., 1967). Essa clivagem resulta na liberação de quatro fibrinopeptídeos (dois fibrinopeptídeos A e dois B) e dá origem a monômeros de fibrina com as novas sequências N-terminal Gly-Pro-Arg na cadeia A α e Gly-His-Arg na cadeia B β . Estas novas sequências são

responsáveis pelas reações de polimerização que ocorrem em seguida entre os monômeros, levando ao coágulo de fibrina insolúvel (DAVIE et al., 1991).

A visualização das bandas referentes às cadeias do fibrinogênio por SDS-PAGE sugere que a BpirSP27 age preferencialmente sobre a cadeia B β enquanto que a BpirSP41 é capaz de degradar as cadeias A α e B β após um período de reação de 2 h (**Fig. 12**). Considerando estes resultados e aqueles sobre o substrato S-2238 (**Fig. 17A**), pode-se dizer que as duas serinoproteases de *B. pirajai* são enzimas trombina-símile.

Embora a análise da ação fibrinogenolítica por SDS-PAGE indique que a ação proteolítica das serinoproteases de *B. pirajai* sobre o fibrinogênio ocorra de forma específica sobre as cadeias A α e/ou B β , somente uma análise mais aprofundada por HPLC, por exemplo, poderia dizer se a degradação promovida por estas enzimas é de fato limitada à liberação dos fibrinopeptídeos A e/ou B, como descrito na literatura (PIRKLE et al., 1986; SERRANO et al., 2000; MAGALHÃES et al., 2007; TAN, 2010). Alguns trabalhos mostram também que a intensidade da ação de serinoproteases de peçonhas de serpentes sobre as cadeias A α e B β do fibrinogênio depende do tempo de reação, sendo que a cadeia γ não é afetada mesmo depois de prolongados períodos de incubação (SELISTRE; GIGLIO, 1987; LÔBO DE ARAÚJO et al., 1998; VILCA-QUISPE et al., 2010).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes são, em sua grande maioria, classificadas como enzimas coagulantes, mas há também aquelas que não são capazes de degradar o fibrinogênio, como a PA-BJ de *B. jararaca* (SERRANO et al., 1995). Na maioria das vezes, estas enzimas agem apenas sobre a cadeia A α do fibrinogênio, como é o caso das enzimas batroxobin da peçonha de *B. atrox* (STOCKER; BARLOW, 1976), bothrombin (NISHIDA et al., 1994) e KN-BJ de *B. jararaca* (SERRANO et al., 1998), bhalternin de *B. alternatus* (COSTA et al., 2010), BjussuSP-I de *B. jararacussu* (SANT'ANA et al., 2008a), entre várias outras. O grupo de serinoproteases coagulantes que agem preferencialmente sobre a cadeia B β do fibrinogênio inclui as enzimas contortrixobin da peçonha de *Agkistrodon contortrix contortrix* (HERZIG et al., 1970), stejnefibrase 2 de *Trimeresurus stejnegeri* (GAO et al., 1998), jerdofibrase de *Trimeresurus jerdonii* (JIN et al., 2001), halystase de *Agkistrodon halys blomhoffii* (MATSUI et al., 1998), mucrosobin de *Trimeresurus mucrosquamatus* (GUO et al., 2001), jararassin-I de *B. jararaca* (VIEIRA et al., 2004)

e BJ-48 de *B. jararacussu* (SILVA-JUNIOR et al., 2007). Entre as enzimas que agem tanto sobre as cadeias A α quanto B β podem ser citadas a FC-Bj (ZAGANELLI et al., 1996) e a jararacussin-I de *B. jararacussu* (BORTOLETO et al., 2002), a MOO3 de *B. moojeni* (OLIVEIRA et al., 1999), a gabonase de *Bitis gabonica* (PIRKLE et al., 1986), a bilineobin de *Agkistrodon bilineatus* (KOMORI et al., 1993) e a brevinase de *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus* (LEE et al., 1999).

A clivagem específica do fibrinogênio promovida pelas serinoproteases de *B. pirajai* deve estar, ao menos parcialmente, relacionada com a capacidade destas enzimas em coagular o plasma humano. A determinação da dose coagulante mínima (DCM) para cada uma das enzimas mostrou que a BpirSP27 apresentou menor potencial coagulante (DCM ~20 μ g) do que a BpirSP41 (DCM ~3,5 μ g) (**Fig. 19**), o que deve estar relacionado à clivagem preferencial apenas da cadeia B β do fibrinogênio pela BpirSP27 contra a clivagem das cadeias A α e B β pela BpirSP41 (**Fig. 12**), estando esta última enzima mais próxima da atividade fibrinogenolítica promovida pela trombina. A serinoprotease trombina-símile de *B. asper* apresentou DCM de aproximadamente 4,1 μ g sobre o plasma humano (PÉREZ et al., 2008), uma dose próxima àquela obtida para a BpirSP41. Já Costa e colaboradores (2009) obtiveram uma DCM de aproximadamente 1,3 μ g para a BpSP-I de *B. pauloensis*, o que indica um maior potencial coagulante para esta enzima.

Além de agirem sobre o fibrinogênio, é possível que a BpirSP27 e BpirSP41 promovam coagulação do plasma por ação sobre outros fatores da cascata de coagulação, conforme avaliado pela atividade das enzimas sobre diversos substratos cromogênicos (**Fig. 18**). Estes substratos são comumente utilizados para avaliar a capacidade de enzimas em hidrolisar substratos específicos e assim, poder relacioná-las a outras enzimas, como a trombina, a calicreína ou outras da cascata de coagulação. Os resultados obtidos sugerem uma ação das serinoproteases de *B. pirajai* sobre diferentes componentes da cascata de coagulação, porém, cabe ressaltar que estes dados podem não refletir os verdadeiros efeitos que ocorrem *in vivo*, já que estas reações no organismo estão sujeitas a diversos fatores que não estão presentes nos testes *in vitro*. Dessa forma, embora tanto a BpirSP27 quanto a BpirSP41 tenham hidrolisado os substratos específicos para calicreína glandular e plasmática (S-2266 e S-2302, respectivamente), por exemplo, não se pode dizer que estas são enzimas calicreína-símile sem avaliar seus potenciais em liberar cininas a

partir de cininogênio plasmático. De acordo com Magalhães e colaboradores (2007), apesar da serinoprotease leucurobin isolada da peçonha de *B. leucurus* apresentar alta atividade proteolítica sobre os substratos S-2302 e S-2266, a enzima mostrou-se desprovida de atividade caliceína-símile, não liberando cinina a partir de plasma bovino.

Algumas serinoproteases do gênero *Bothrops*, como a BjussuSP-I e a BpSP-I (SANT'ANA et al., 2008b; COSTA et al., 2009) foram capazes de hidrolisar os substratos S-2238 e S-2288 (específicos para trombina), apresentando atividade também sobre os substratos S-2302 (para caliceína plasmática, fator XIa e XIIa) e S-2266 (para caliceína glandular e fator XIa), porém sem atividade sobre o substrato S-2251, específico para plasmina. Resultados semelhantes foram observados para as enzimas crotalase, cerastobin e FC-Bj, que foram classificadas tanto como trombina-símile quanto como caliceína-símile (MARKLAND et al., 1982; FARID et al., 1989; ZAGANELLI et al., 1996).

Da mesma forma que a maioria das serinoproteases de peçonhas de serpentes é capaz de promover coagulação pela ação proteolítica sobre o fibrinogênio, existem também aquelas capazes de agir sobre o processo de fibrinólise, degradando o coágulo de fibrina de forma direta ou indireta pela formação de plasmina. A primeira destas enzimas a ser estudada foi a TSV-PA de *Trimeresurus stejnegeri*, que converte o plasminogênio em plasmina pela hidrólise seletiva da ligação peptídica entre os resíduos Arg561-Val562 do plasminogênio, da mesma forma que os ativadores fisiológicos tPA e uPA (ZHANG et al., 1995; BRAUD et al., 2000a). Outras enzimas, como a haly-PA de *Agkistrodon halys* (PARK et al., 1998) e a LV-PA de *Lachesis muta muta* (SANCHEZ et al., 2000), também apresentaram atividade fibrinolítica pela conversão de plasminogênio em plasmina. Interessantemente, estas duas enzimas só foram capazes de degradar o coágulo de fibrina *in vitro* na presença de plasminogênio, mostrando uma ação fibrinolítica indireta e dependente da formação de plasmina (PARK et al., 1998; SANCHEZ et al., 2000).

Como somente a BpirSP27 apresentou atividade sobre o substrato S-2251 para plasmina (**Fig. 18D**), pode-se sugerir que esta enzima deve exibir maior ação sobre o sistema fibrinolítico do que a BpirSP41. No entanto, os resultados mostraram que a BpirSP27 apresentou menor ação lítica sobre o coágulo de fibrina

in vitro em comparação à BpirSP41 (**Fig. 13A**). Sendo assim, o modelo experimental de fibrinólise utilizado no presente trabalho mostra que as serinoproteases de *B. pirajai* agem diretamente sobre coágulos de fibrina, dependendo da dose e do tempo, embora não seja possível dizer se por mecanismos de degradação específicos ou não. Além disso, a atividade trombolítica das enzimas sobre coágulos de sangue formados *in vitro* corrobora estes resultados, com maior degradação promovida pela BpirSP41 em comparação à BpirSP27 (**Fig. 13B**).

Apesar de várias serinoproteases de peçonhas de serpentes apresentarem atividade tanto sobre fibrina quanto sobre fibrinogênio, algumas simplesmente não são fibrinolíticas (MARKLAND, 1998). Sant'Ana e colaboradores (2008a), por exemplo, mostraram que a BjussuSP-I apresentou atividade fibrinolítica dependente da dose e do tempo. Já outras serinoproteases provenientes de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, como a BPA (PAES-LEME et al., 2008) e BpSP-I (COSTA et al., 2009), não foram capazes de degradar coágulos de fibrina.

Estudos recentes têm explorado o potencial de serinoproteases de peçonhas de serpentes como agentes trombolíticos, considerando suas características específicas como a não susceptibilidade a inibidores endógenos e suas ações sobre a formação de trombos em mamíferos (GARDINER; ANDREWS, 2008). A enzima BPA da peçonha de *B. jararaca*, por exemplo, é capaz de clivar seletivamente as cadeias A α e B β do fibrinogênio no plasma humano sem induzir coagulação, causando depleção do fibrinogênio plasmático e debilitando a formação de trombos *in vivo*. Além disso, a atividade da BPA não foi susceptível à inibição pelo inibidor endógeno antitrombina, e exibiu uma alta estabilidade enzimática devido ao seu alto grau de glicosilação (PAES-LEME et al., 2008). Outra serinoprotease chamada harobin, da peçonha da serpente marinha *Lapemis hardwickii*, degrada eficientemente a cadeia B β e fracamente a cadeia A α do fibrinogênio, sem formar fibrina e sem ser inibida por inibidores plasmáticos, atuando como um agente defibrinogenante tanto *in vitro* quanto *in vivo* em ratos. Esta enzima também mostrou ser capaz de clivar angiotensina, resultando na diminuição da pressão sanguínea em ratos, e de formar bradicinina a partir de cininogênio, resultando em vasodilatação (HE et al., 2007). Além destas enzimas, algumas serinoproteases trombina-símile de peçonhas de serpentes também têm sido avaliadas quanto aos

seus potenciais trombolíticos, como já mencionado anteriormente para as enzimas ancrod e batroxobin (GARDINER; ANDREWS, 2008).

O TAME é um substrato artificial que apresenta ligação éster com o aminoácido arginina, e assim sendo, é comumente utilizado para a análise da atividade enzimática de enzimas como a tripsina, a trombina e serinoproteases em geral. Quando avaliadas em relação às suas atividades sobre este substrato, as serinoproteases de *B. pirajai* mostraram ser bastante estáveis a diferentes pHs (**Fig. 15**) e temperaturas (**Fig. 16**), sendo a BpirSP41 aparentemente menos afetada por tais variações do que a BpirSP27. Estes resultados estão de acordo com diversos estudos que mostram que serinoproteases costumam ser resistentes à inativação por temperaturas e pHs extremos, ao contrário do que é observado para as metaloproteases (SWENSON; MARKLAND, 2005).

Alguns estudos atribuem a resistência à desnaturação das serinoproteases a carboidratos covalentemente ligados a estas enzimas (MAHAR et al., 1987; SIIGUR et al., 1991), o que poderia explicar a maior estabilidade da BpirSP41 (que apresenta maior grau de N-glicosilação) em comparação à BpirSP27. Confirmando esta teoria, Lee e colaboradores (1999) mostraram que a termoestabilidade da brevinase foi perdida quando esta serinoprotease foi deglicosilada, e Silva-Junior e colaboradores (2007) obtiveram resultados semelhantes para a BJ-48, mostrando que a enzima nativa apresentou maior termoestabilidade em relação à enzima deglicosilada.

Diferentes ensaios são descritos na literatura para avaliar a estabilidade da atividade enzimática de serinoproteases frente a variações de pH e temperatura ou ação de inibidores e íons metálicos, como testes de coagulação, atividade fibrinogenolítica, hidrólise de substratos cromogênicos ou de substratos sintéticos como o TAME e o BApNA (N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida) (BORTOLETO et al., 2002; SILVA-JUNIOR et al., 2007; SANT'ANA et al., 2008a; COSTA et al., 2009; COSTA et al., 2010).

Zaganelli e colaboradores (1996) utilizaram a atividade amidolítica sobre o BApNA para avaliar a estabilidade da serinoprotease FC-Bj de *B. jararacussu*, que apresentou valores ótimos em pH 8,0 e temperatura de 37°C. Além disso, a atividade da enzima foi reduzida com o aumento na temperatura, mantendo 30% da

atividade a 70°C, e teve valores superiores a 80% na faixa de pH entre 7,0 e 10,0. Bortoleto e colaboradores (2002) avaliaram a atividade da serinoprotease jararacussin-I de *B. jararacussu* sobre o TAME, mostrando atividade ótima na temperatura de 37°C e na faixa de pH entre 7,4 e 8,0, com atividade bastante reduzida nas temperaturas de 4 e 75°C. Similarmente, Silva-Junior e colaboradores (2007) aferiram a atividade sobre TAME de outra serinoprotease de *B. jararacussu*, a BJ-48, que se mostrou máxima em pH 7,5, com atividade 55% da máxima em pH 6,0 e cerca de 15% em pH 9,0, com 81% da atividade máxima observada em pH 8,0. Ainda neste estudo, os autores utilizaram o BApNA para avaliar a termoestabilidade da BJ-48, exibindo taxas de hidrólise máximas entre as temperaturas de 25 e 50°C, com perda de cerca de 50 % desta atividade em temperaturas acima de 60°C e com inativação total a 80°C (SILVA-JUNIOR et al., 2007). Sant'Ana e colaboradores (2008a) utilizaram as atividades coagulante e fibrinogenolítica da BjussuSP-I, também de *B. jararacussu*, para testar sua estabilidade. Esta enzima mostrou ser bastante estável inclusive em temperaturas abaixo de zero, com redução drástica da atividade apenas na temperatura de 100°C. Em relação a variações de pH, a BjussuSP-I apresentou atividade estável na faixa de pH entre 4,5 e 8,0, com reduções significativas em pHs 2,5 e 3,5 e pequena redução no pH 10,0 (SANT'ANA et al. 2008a). Costa e colaboradores (2009) utilizaram as atividades coagulante e fibrinogenolítica para mostrar que a BpSP-I de *B. pauloensis* apresentou atividade estável na faixa de pH entre 3,0 e 9,0 e temperaturas entre -70 e 37°C. Em outro estudo, Costa e colaboradores (2010) observaram que a atividade fibrinogenolítica da bhalterin de *B. alternatus* foi estável nas temperaturas de 30-40°C e pHs entre 5,0 e 10,0.

A atividade das serinoproteases de *B. pirajai* sobre o substrato S-2238 sofreu uma grande influência após pré-incubação com o íon Cu^{2+} , que inibiu quase completamente a atividade de ambas as enzimas. Outros íons como Ba^{2+} e Ca^{2+} não influenciaram significativamente a atividade de nenhuma das serinoproteases, enquanto que o íon Mn^{2+} promoveu redução apenas da atividade da BpirSP27 (**Fig. 17B**). Ao contrário do que é observado para as metaloproteases, que são enzimas dependentes do íon Zn^{2+} (MATSUI et al., 2000), as serinoproteases não são descritas como dependentes de qualquer íon. De fato, estudos mostram que, assim como a tripsina e diferentemente da trombina, as serinoproteases de peçonhas de

serpentes não sofrem regulação alostérica pelo íon Na^+ , devido à substituição na posição 225 por um resíduo de prolina conservado (CASTRO et al., 2001; 2004).

O efeito de íons metálicos sobre as atividades de serinoproteases apresenta resultados bastante discrepantes na literatura. Similarmente ao observado para a BpirSP27 e a BpirSP41, Costa e colaboradores (2009) avaliaram a influência dos íons Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} sobre a atividade coagulante da BpSP-I, mostrando inibição significativa desta atividade somente na presença do Cu^{2+} . Sant'Ana e colaboradores (2008a) mostraram que a atividade coagulante da BjussuSP-I sofreu efeito negativo dos íons Mn^{2+} e Fe^{2+} , e em menor escala dos íons Zn^{2+} e Co^{2+} , não sendo influenciada pela presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Já a hidrólise do TAME pela fração coagulante F-II-1-a da peçonha de *B. lanceolatus* não sofreu influência na presença dos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+} (LÔBO DE ARAÚJO et al., 1998). Lee e colaboradores (1999) avaliaram a ação de diversos cátions metálicos (Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) sobre a atividade fibrinolítica da brevinase, afirmando que somente o Zn^{2+} foi capaz de inibir totalmente tal atividade. Liu e colaboradores (2008) mostraram que a atividade esterásica sobre o TAME da serinoprotease ABUSV-SPase aumentou na presença de Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} , sendo reduzida apenas na presença de Cd^{2+} e não sofrendo influência de Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} . Estes autores sugeriram que os diferentes íons poderiam promover pequenas alterações na conformação das proteínas dependendo de suas características químicas específicas, resultando em diferentes efeitos sobre a atividade da enzima (LIU et al., 2008).

Os resultados descritos acima mostram que, apesar do íon Cu^{2+} ter inibido significativamente a atividade das serinoproteases de *B. pirajai* e da BpSP-I (COSTA et al., 2009), o mesmo não foi observado para as serinoproteases brevinase (LEE et al., 1999) e ABUSV-SPase (LIU et al., 2008). Da mesma forma, o íon Mn^{2+} , que diminuiu a atividade da BpirSP27 e da BjussuSP-I (SANT'ANA et al., 2008a), aumentou a atividade da ABUSV-SPase (LIU et al., 2008) e não causou efeitos significativos sobre as atividades da BpirSP41, BpSP-I (COSTA et al., 2009) e brevinase (LEE et al., 1999). Assim, as diferenças observadas devem possivelmente estar relacionadas a diferenças estruturais entre as enzimas, refletindo em diferentes graus de sensibilidade aos íons.

As atividades das enzimas BpirSP27 e BpirSP41 foram inibidas em diferentes graus após pré-incubação com inibidores específicos de serinoproteases como PMSF, benzamidina, leupeptina e aprotinina, sem sofrer influência de inibidores de metaloproteases como EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina, e com pouca influência dos agentes desnaturantes β -mercaptoetanol e DTT na concentração de 1 mM (**Fig. 14**).

A inibição das serinoproteases por tratamento com inibidores específicos pode ser promovida de maneira reversível ou irreversível. O PMSF, por exemplo, tem a capacidade de se ligar de maneira específica ao resíduo de serina do sítio catalítico de serinoproteases, formando uma ligação irreversível que inativa a atividade destas enzimas. Outros inibidores, como a leupeptina e a benzamidina, competem pelo sítio ativo das serinoproteases e suas ligações são reversíveis, sendo miméticos de arginina ou lisina, que são os aminoácidos pelos quais estas enzimas têm maior especificidade (SERRANO; MAROUN, 2005). A inibição da tripsina pela benzamidina, por exemplo, deve-se à ligação deste inibidor nas proximidades da tríade catalítica, impedindo a ligação do substrato e a entrada de moléculas de água no sítio ativo (MARES-GUIA; SHAW, 1965).

Os resultados para as atividades coagulante (**Fig. 21**), fibrinogenolítica (**Fig. 12**) e esterásica sobre o TAME (**Fig. 14**) obtidos no presente estudo mostraram que a BpirSP41 é menos sensível ao PMSF do que a BpirSP27, embora seja suscetível aos inibidores reversíveis benzamidina e leupeptina. Considerando as diferenças entre estas duas enzimas destacadas até o momento, pode-se sugerir que o maior conteúdo de N-glicanas pode estar relacionado a um maior grau de proteção do resíduo de serina do sítio ativo da BpirSP41, resultando em menor inibição pelo PMSF. No entanto, estudos estruturais mais detalhados devem ser realizados para que esta teoria possa ou não ser confirmada.

O tratamento de serinoproteases com inibidores específicos como o PMSF pode promover redução ou até mesmo perda total de suas atividades enzimáticas (SERRANO et al., 1993; GAO et al., 1998; SANT'ANA et al., 2008b; COSTA et al., 2009). Contudo, diversos estudos mostram que o efeito de inibidores sobre a atividade de serinoproteases pode variar muito, dependendo da enzima e das concentrações de inibidores utilizadas. Cho e colaboradores (2001) mostraram que a atividade proteolítica da enzima trombina-símile isolada de *Agkistrodon caliginosus* (calobin II) foi quase totalmente inibida pelo PMSF, enquanto que outros inibidores

como benzamidina e aprotinina reduziram apenas cerca de 20% da atividade da enzima. Já Vieira e colaboradores (2004) mostraram que a atividade coagulante da jararassin-I de *B. jararaca* foi inibida em maior intensidade pela benzamidina do que pelo PMSF.

Vários derivados de benzamidina já foram descritos como inibidores competitivos de serinoproteases de peçonhas de serpentes, incluindo as enzimas do gênero *Bothrops* batroxobin (STURZEBECKER et al., 1986), PA-BJ, KN-BJ e TL-BJ (SERRANO et al., 1995; 1998; 2000). A leupeptina também mostrou ação inibitória sobre a atividade de diversas enzimas, como a MOO3 (OLIVEIRA et al., 1999), a BjussuSP-I (SANT'ANA et al., 2008a), a BpSP-I (COSTA et al., 2009), a halystase (MATSUI et al., 1998) e a bilineobin (KOMORI et al., 1993).

Embora geralmente as serinoproteases de peçonhas de serpentes não sejam sensíveis à ação de inibidores endógenos (conhecidos como serpins), como a antitrombina-III, a hirudina e a aprotinina (SERRANO; MAROUN, 2005), no presente trabalho foi observado que tanto a BpirSP27 quanto a BpirSP41 tiveram suas atividades sobre o TAME significativamente reduzidas na presença da aprotinina (**Fig. 14**). Braud e colaboradores (2000b; 2002) mostraram que a falta de inibição da TSV-PA de *Trimeresurus stejnegeri* por inibidores endógenos deve-se à proteção promovida pelo loop-37 e pelo resíduo Phe193, sendo que quando este resíduo é substituído por glicina, a enzima torna-se sensível à aprotinina. Apesar deste resíduo não ter sido obtido no sequenciamento parcial das serinoproteases de *B. pirajai*, pelos alinhamentos múltiplos apresentados nas figuras **10** e **11** pode-se verificar que a maioria das serinoproteases de peçonhas de serpentes listadas apresenta um resíduo de glicina e não de fenilalanina na posição em questão (178), o que provavelmente deve refletir na sensibilidade destas enzimas à aprotinina.

Os quelantes de metal EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina, comumente usados como inibidores de metaloproteases, não foram capazes de promover redução significativa nas atividades das enzimas BpirSP27 e BpirSP41 (**Fig. 14**). Tais resultados confirmam que as atividades das serinoproteases de *B. pirajai* não dependem de qualquer íon metálico, diferentemente do observado para as metaloproteases. Embora não seja comum, também existem relatos de serinoproteases que tiveram suas atividades diminuídas na presença de inibidores como o EDTA (SERRANO et al., 1993; OLIVEIRA et al., 1999; VILCA-QUISPE et al.,

2010; VALERIANO-ZAPANA et al., 2012) e 1,10-fenantrolina (SANT'ANA et al., 2008a).

A diminuição das atividades da BpirSP27 e da BpirSP41 sobre o TAME após pré-tratamento com os agentes desnaturantes β -mercaptoetanol e DTT (**Fig. 14**) sugere a importância das pontes dissulfeto na estabilização das estruturas nativas destas enzimas, refletindo na conservação de suas atividades. Estudos mostram que a desnaturação promovida por estes agentes comumente afetam as atividades biológicas das serinoproteases de peçonhas de serpentes (CASTRO et al., 2004), como descrito para as enzimas MOO3 de *B. moojeni* (OLIVEIRA et al., 1999), flavoviridiobin de *Trimeresurus flavoviridis* (TATEMATSU et al., 2000) e leucurobin de *B. leucurus* (MAGALHÃES et al., 2007). Apesar das inibições das serinoproteases de *B. pirajai* terem sido pequenas (apenas a inibição da BpirSP27 com DTT foi considerada estatisticamente significativa para $p < 0,05$), pode ser que, em concentrações maiores do que a avaliada (1 mM), os efeitos destes agentes desnaturantes sobre as enzimas sejam mais pronunciados.

A maioria das serinoproteases de peçonhas de serpentes são glicoproteínas que contém números variados de sítios de glicosilação ligados à asparagina em posições não-homólogas de suas sequências de aminoácidos (MATSUI et al., 2000). A glicosilação é uma das modificações pós-traducionais mais complexas que ocorrem em proteínas, apresentando importantes funções estruturais e funcionais que incluem a proteção estérica da proteína à proteólise e participação em outros processos biológicos como reconhecimento antigênico e interações com células (HEBERT et al., 2005; SOARES; OLIVEIRA, 2009). Além disso, carboidratos N-ligados são também importantes para o enovelamento correto de domínios funcionais essenciais à atividade de várias toxinas de peçonhas de serpentes (SOARES; OLIVEIRA, 2009).

O processo de N-glicosilação ocorre em sítios de sequência consenso de Asn-X-Ser/Thr, onde X é qualquer aminoácido exceto a prolina (GAVEL; VON HEIJNE, 1990). Possíveis sítios de N-glicosilação podem ser observados nas sequências de aminoácidos presentes nas figuras **10** e **11**, incluindo um na sequência parcial da BpirSP27 e outro na da BpirSP41. A presença destes sítios nas proximidades da tríade catalítica das serinoproteases é usualmente descrita como um possível fator de influência sobre as atividades das enzimas (SOARES;

OLIVEIRA, 2009). Algumas serinoproteases altamente glicosiladas, como a BPA de *B. jararaca* (MURAYAMA et al., 2003), apresentam vários possíveis sítios de glicosilação, embora não necessariamente todos estejam ocupados por carboidratos (SOARES; OLIVEIRA, 2009).

Os carboidratos N-ligados às enzimas BpirSP27 e BpirSP41 mostraram ser importantes para suas atividades coagulantes, uma vez que após deglicosilação com PNGase F, nenhuma das serinoproteases foi capaz de coagular o plasma humano nas doses e tempos de reação avaliados (**Fig. 22**). A importância da presença de carboidratos na relação estrutura-função das serinoproteases ainda não é totalmente compreendida. Em muitos casos, como neste da BpirSP27 e da BpirSP41, da BjussuSP-I (SANT'ANA et al., 2008b) e da BpSP-I (COSTA et al., 2009), demonstrou-se que a N-glicosilação interfere na atividade catalítica das enzimas. Da mesma forma, Zhu e colaboradores (2005) mostraram que a diferença entre a eficiência catalítica de duas serinoproteases da peçonha de *Agkistrodon acutus* estaria relacionada à presença de diferentes glicanas próximas ao sítio ativo destas enzimas. Entretanto, outros estudos relatam que, para algumas serinoproteases, os carboidratos são mais importantes para a estabilização da enzima do que para sua atividade catalítica (KOMORI; NIKAI, 1998).

Além da importância das N-glicanas para a atividade das serinoproteases de *B. pirajai*, os resultados obtidos para variações de pH, temperatura e inibidores também sugerem a importância do conteúdo de carboidratos destas enzimas em suas estabilidades, como já discutido anteriormente. De fato, estudos indicam que N-glicanas estejam envolvidas no bloqueio estérico do acesso de inibidores macromoleculares ao sítio ativo das enzimas (SOARES; OLIVEIRA, 2009), como descrito para a forma deglicosilada da BJ-48 de *B. jararacussu*, por exemplo, que foi mais suscetível à inibição pela aprotinina do que sua forma nativa (SILVA-JUNIOR et al., 2007).

As plaquetas desempenham um papel essencial no sistema hemostático, participando da formação de trombos que contém a lesão de vasos sanguíneos e contribuindo com receptores de membrana que facilitam e amplificam a atividade localizada dos fatores de coagulação do sangue (RUGGERI; MENDOLICCHIO, 2007). A secreção, ativação e agregação plaquetária são induzidas fisiologicamente por baixas concentrações de trombina ou pela interação das plaquetas com

componentes do tecido conjuntivo subendotelial, especialmente o colágeno (FEINSTEIN; FRASER, 1975). A ativação das plaquetas causa uma mudança conformacional no receptor plaquetário GPIIb/IIIa, que torna-se suscetível a diferentes ligantes como o fibrinogênio, possibilitando a agregação entre as plaquetas (WENCEL-DRAKE et al., 1996; GOMES et al., 2000).

Ambas as serinoproteases de *B. pirajai* foram capazes de promover certo grau de agregação sobre plaquetas lavadas, na presença ou ausência de cálcio (**Fig. 23**). A BpirSP27 chegou a induzir cerca de 60% de agregação na presença de cálcio e na maior concentração avaliada, enquanto que a agregação induzida pela BpirSP41 se estabilizou em torno de 20%, independentemente do aumento da concentração da enzima ou da presença de cálcio.

A agregação plaquetária é um fenômeno dependente de cálcio, esteja este íon atuando como gatilho fisiológico para a ativação e secreção das plaquetas (FEINSTEIN; FRASER, 1975) ou mantendo a estrutura heterodimérica do complexo GPIIb/IIIa (PHILLIPS et al., 1988). O fato das serinoproteases de *B. pirajai* induzirem agregação na ausência de cálcio mostra que o mecanismo de ação destas enzimas é independente deste íon, o que poderia indicar um efeito aglutinante e não agregante sobre plaquetas, já que a aglutinação é um processo não dependente de cálcio. No entanto, a atividade induzida pela BpirSP27 foi maior na presença de cálcio, indicando que esta enzima pode estar relacionada ao influxo deste íon nas plaquetas, levando a uma sinalização intracelular que culminaria na secreção de grânulos plaquetários e amplificação da agregação (FEINSTEIN; FRASER, 1975). Contudo, outros estudos são necessários para que os mecanismos pelos quais estas serinoproteases induzem tais efeitos sejam determinados. Além disso, somente estudos estruturais associados a possíveis mecanismos de ação poderiam elucidar o porquê da maior atividade da BpirSP27 sobre plaquetas em comparação à BpirSP41.

Diversas serinoproteases de peçonhas de serpentes são capazes de ativar a agregação plaquetária de diferentes maneiras. Algumas delas ativam plaquetas similarmente à trombina, independentes da presença de fibrinogênio, como é o caso da PA-BJ de *B. jararaca*, que promoveu 95% de agregação plaquetária sobre o PRP na concentração de 0,32 nM (SERRANO et al., 1995), da thrombocytin de *B. atrox* (NIEWIAROWSKI et al., 1979) e da cerastocytin de *Cerastes cerastes* (MARRAKCHI

et al., 1995a). A MSP1 de *B. moojeni* também apresentou alto potencial indutor de agregação plaquetária, promovendo 75% de agregação sobre o PRP e 40% sobre plaquetas lavadas na concentração de 10^{-8} M, enquanto que a MSP2 da mesma peçonha precisou de uma concentração 20 vezes maior para promover o mesmo efeito (SERRANO et al., 1993). Além disso, a MSP1 aumentou a agregação plaquetária induzida pelo ADP, sugerindo uma capacidade de liberar pequenas concentrações de constituintes plaquetários que agiriam sinergicamente às substâncias granulares liberadas pelo ADP, levando a uma reação de agregação irreversível (YARDUMIAN et al., 1986; SERRANO et al., 1993).

A bothrombin de *B. jararaca* (NISHIDA et al., 1994) e a cerastotin de *Cerastes cerastes* (MARRAKCHI et al., 1995b) foram capazes de agregar plaquetas lavadas somente na presença de fibrinogênio exógeno. Já as enzimas TLBm de *B. marajoensis* (VILCA-QUISPE et al., 2010) e TLBan de *B. andianus* (VALERIANO-ZAPANA et al., 2012) foram capazes de induzir uma potente agregação plaquetária sobre PRP e sobre plaquetas lavadas nas concentrações de 1 mg/mL e 5 µg/mL, respectivamente.

Embora os mecanismos de ativação plaquetária de algumas serinoproteases não sejam conhecidos, já foi relatado que a thrombocytin (NIEWIAROWSKI et al., 1979) e a PA-BJ (SERRANO et al., 1995) induzem agregação plaquetária por ativação dos receptores PAR-1 e PAR-4 de plaquetas humanas, os mesmos receptores que medeiam o efeito da trombina sobre plaquetas (BRAUD et al., 2000a). Vale ressaltar ainda que a agregação plaquetária induzida por estas serinoproteases parece ser dependente da integridade do sítio catalítico, uma vez que esta atividade é inibida pelo PMSF (SERRANO et al., 1993; 1995; VILCA-QUISPE et al., 2010; VALERIANO-ZAPANA et al., 2012).

Da mesma forma que diversas serinoproteases induzem agregação plaquetária, como no caso da BpirSP27 e das enzimas descritas anteriormente, outras não são capazes de induzir ou inibir tal atividade, como observado para a jerdofibrase de *Trimeresurus jerdonii* (JIN et al., 2001), para a BjussuSP-I de *B. jararacussu* (SANT'ANA et al., 2008b) e para a agacutin de *Agkistrodon acutus* (TANG et al., 2009).

Os resultados dos ensaios sobre o sistema complemento sugerem que as enzimas BpirSP27 e BpirSP41 foram capazes de induzir modulação das VC/VL e VA em diferentes graus. A BpirSP41 apresentou maiores efeitos inibitórios sobre as VC/VL do que a BpirSP27, com valores de inibição próximos de 40 e 20%, respectivamente, para a concentração de 200 µg/mL (**Fig. 25**). Comparando as IC₅₀ estimadas para as duas serinoproteases, fica ainda mais evidente que a BpirSP41 apresentou ação inibitória bastante superior àquela da BpirSP27. Em relação à VA, ambas as enzimas mostraram porcentagens de inibição ao redor de 20% para a concentração de 200 µg/mL (**Fig. 27**), indicando efeitos inibitórios similares sobre esta via do sistema complemento.

O aumento do t_{1/2} após pré-incubação do SHN com as serinoproteases de *B. pirajai* (**Figs. 24 e 26**) indica que estas enzimas agem sobre o complemento, embora não seja possível somente pela metodologia utilizada no presente trabalho concluir se os efeitos observados devem-se à ativação e/ou inativação de componentes ou a bloqueios nas vias de ativação e/ou de proteínas reguladoras do sistema. Estudos mais detalhados utilizando componentes isolados do complemento, como C2, C3, C4 e C5, devem ser realizados para tentar elucidar os efeitos inibitórios das enzimas BpirSP27 e BpirSP41 sobre este sistema.

Estudos mostram que compostos de peçonhas animais podem modular o sistema complemento por diversos mecanismos, seja agindo pela clivagem direta de um componente específico ou interagindo com componentes para formar complexos capazes de amplificar e ativar a cascata do complemento (DIAS DA SILVA et al., 1995). O CVF da peçonha de *Naja naja kaouthia*, por exemplo, promove a clivagem direta de proteínas do complemento, como C2, C3 e C4, e a estabilização da C3 convertase da VA, gerando a amplificação da cascata de ativação e a formação das anafilatoxinas C3a e C5a, além de outros fragmentos de ativação como C3b e C4b (MÜLLER-EBERHARD; FJELLSTRÖM, 1971). Uma protease da peçonha de *Vipera lebetina* causou diminuição da atividade hemolítica do soro humano relacionada às VC e VA, sendo este efeito atribuído à clivagem proteolítica das cadeias α dos componentes C3 e C4 (GASMI et al., 1994). A metaloprotease atrase B isolada da peçonha de *Naja atra* inibiu a ativação das VC e VA do complemento de maneira dependente da dose e do tempo, clivando os componentes C6, C7, C8 e o fator B (SUN; BAO, 2010). Já a serinoprotease flavoxobin isolada da peçonha de

Trimeresurus flavoviridis foi capaz de ativar a VA, agindo como uma C3 convertase que cliva o componente C3 na posição Arg726-Ser727 em C3a e C3b de forma independente e específica, iniciando a cascata do complemento (YAMAMOTO et al., 2002).

Com relação ao gênero *Bothrops*, Pidde-Queiroz e colaboradores (2010) mostraram que diversas peçonhas botrópicas, incluindo a de *B. pirajai*, foram capazes de ativar a via clássica do sistema complemento mesmo na ausência de anticorpo sensibilizante, e esta ativação mostrou estar associada, ao menos parcialmente, à clivagem do inibidor plasmático C1-INH por proteases presentes nestas peçonhas. A clivagem deste inibidor, bem como dos componentes isolados C3 e C4, foi avaliada utilizando inibidores específicos de metaloproteases e serinoproteases (1,10-fenantrolina e PMSF, respectivamente), e os resultados indicaram que estes devem ser os principais componentes das peçonhas responsáveis pelas ações observadas sobre o sistema complemento humano (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010).

As serinoproteases de *B. pirajai* apresentaram efeitos discretos sobre processos inflamatórios como a indução de edema (**Fig. 28**) e dor (**Fig. 29**), sugerindo que estas enzimas devem apresentar um papel menor na inflamação promovida pela peçonha de *B. pirajai*, de maneira similar ao relatado para a peçonha de *B. jararaca* (ZYCHAR et al., 2010). Como a ação edematogênica e nociceptiva destas serinoproteases foi pouco significativa, não foi possível avaliar quais seriam os possíveis mediadores envolvidos no edema e dor induzidos por estas enzimas.

Diversos estudos mostram a ação de peçonhas botrópicas na indução de dor e edema em ratos e camundongos, com baixas doses induzindo efeitos bastante exacerbados. Em um destes estudos, Barbosa e colaboradores (2003) mostraram que a peçonha de *B. insularis* foi capaz de induzir mais de 100% de aumento do volume da pata de camundongos no pico da resposta edematogênica (3 h após injeção da peçonha) em doses muito baixas (0,1 e 0,25 µg), sendo esta porcentagem aumentada para mais de 300% com o aumento das doses para 0,5, 1 e 2,5 µg/pata. Em doses mais altas de peçonhas, muitas vezes ocorre a formação de hemorragia juntamente com o edema, como descrito para as peçonhas de *B. insularis* (BARBOSA et al., 2003), *B. asper* (LOMONTE et al., 1993; CHAVES et al., 1995), *B. jararaca* (TREBIEN; CALIXTO, 1989; PERALES et al., 1992) e *B.*

lanceolatus (LÔBO DE ARAÚJO et al., 2000), indicando a participação de metaloproteases nestes processos. Estas proteases são capazes de induzir a formação de edema devido à hidrólise de proteínas dos vasos, induzindo um processo inflamatório acompanhado de migração de neutrófilos e liberação de mediadores inflamatórios, com aumento do calibre vascular e do extravasamento de plasma (TEIXEIRA et al., 2009).

Em relação à classe das serinoproteases, a enzima trombina-símile TLBm isolada da peçonha de *B. marajoensis* apresentou resultados similares aos obtidos para a BpirSP27 e a BpirSP41 quanto à indução de edema, promovendo pequenos aumentos não significativos no volume da pata de camundongos injetados com doses de até 20 µg (VILCA-QUISPE et al., 2010).

O edema induzido por peçonhas botrópicas depende da formação de metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e leucotrienos, formados respectivamente pela ação de ciclooxygenases e lipooxygenases (TEIXEIRA et al., 2009). O edema de pata induzido pelas peçonhas de *B. asper* (CHAVES et al., 1995; CHACUR et al., 2001), *B. insularis* (BARBOSA et al., 2003), *B. jararaca* (TREBIEN; CALIXTO, 1989; PERALES et al., 1992) e *B. lanceolatus* (LÔBO DE ARAÚJO et al., 2000) foram atenuados por inibidores de ciclooxygenases como indometacina e ácido acetilsalicílico, sugerindo a importância das prostaglandinas para este processo inflamatório. Ademais, produtos de lipooxygenases também podem participar na indução de edema por peçonhas botrópicas, como descrito para as de *B. lanceolatus* (FARIA et al., 2001) e *B. jararaca* (TREBIEN; CALIXTO, 1989). Outros mediadores comumente relacionados à indução de edema são a histamina, a serotonina e o óxido nítrico (BARBOSA et al., 2003).

A primeira evidência de que peçonhas botrópicas causavam hiperalgesia foi relatada para a peçonha de *B. jararaca*, a qual induziu uma hiperalgesia persistente e independente da progressão do edema mediada principalmente por prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF) (TEIXEIRA et al., 1994). Outra peçonha botrópica, a de *B. asper*, causou hiperalgesia dependente da dose (5-15 µg/pata) e do tempo (1-6 h), com resposta máxima 2 h após sua injeção na pata de ratos (CHACUR et al., 2001). No mesmo estudo foram utilizados diferentes medicamentos para investigar os mediadores envolvidos nesta resposta,

sugerindo a participação de bradicinina, fosfolipases A₂ e leucotrienos, mas não de ciclooxigenases e PAF (CHACUR et al., 2001).

Corroborando os efeitos pró-inflamatórios já descritos, a avaliação dos exsudatos inflamatórios induzidos pelas serinoproteases de *B. pirajai* mostrou que estas enzimas promoveram pequenos aumentos na quantidade de leucócitos presentes na cavidade peritoneal de camundongos 6 e 24 h depois da administração (**Fig. 30**). Embora as enzimas BpirSP27 e BpirSP41 não tenham induzido um aumento quantitativo significativo, uma infiltração proeminente de neutrófilos foi observada nos lavados peritoneais depois de 6 h da administração (**Fig. 31A**), indicando que estas enzimas devem contribuir, mesmo que em menor escala, para a resposta inflamatória aguda promovida pela peçonha de *B. pirajai*. Após 24 h da administração, o número de neutrófilos permanece aumentado (**Fig. 31B**), porém já é menor do que aquele observado no tempo de 6 h, caracterizando o início de uma resposta inflamatória formada principalmente por células mononucleares como linfócitos e monócitos.

Os leucócitos são elementos-chave nas respostas inflamatórias devido às suas atividades fagocitárias e secretórias, migrando ao local afetado em resposta a estímulos inflamatórios variados. Na resposta inflamatória aguda, os neutrófilos migram rapidamente ao local lesado, sendo os principais responsáveis pela fagocitose inicial dos agentes infecciosos e liberação de citocinas (ULBRICH et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2009).

Diversas peçonhas botrópicas, como as de *B. asper* (GUTIÉRREZ et al., 1986), *B. erythromelas*, *B. alternatus* (FLORES et al., 1993), *B. jararaca* (ZYCHAR et al., 2010) e *B. atrox* (MOREIRA et al., 2012), foram descritas como capazes de induzir migração de leucócitos ao local em que foram aplicadas. Gutiérrez e colaboradores (1986) mostraram que a peçonha de *B. asper* induziu infiltrado inflamatório escasso após 6 horas de sua administração no músculo gastrocnêmio de camundongos, promovendo, contudo, um aumento pronunciado após 24, 48 e 72 horas. Após 6 e 24 horas, os infiltrados inflamatórios eram constituídos principalmente de neutrófilos, enquanto que com 48 e 72 horas, as células mononucleares foram o tipo celular predominantemente encontrado (GUTIÉRREZ et al., 1986). Recentemente, Moreira e colaboradores (2012) mostraram que a peçonha de *B. atrox* induziu infiltração de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos

entre uma e oito horas após sua administração, com predomínio de células mononucleares nas primeiras quatro horas e de neutrófilos de quatro a oito horas. O mesmo estudo mostrou ainda que estes efeitos foram associados à produção das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10, e dos eicosanóides PGE₂, PGD₂, tromboxano A₂ (TXA₂) e leucotrieno B₄ (LTB₄) (MOREIRA et al., 2012).

Zychar e colaboradores (2010) atribuíram a capacidade da peçonha de *B. jararaca* em promover migração leucocitária principalmente às metaloproteases. Fernandes e colaboradores (2006) mostraram que a injeção da metaloprotease BaP1 da peçonha de *B. asper* na cavidade peritoneal de camundongos levou a uma acentuada infiltração de neutrófilos e células mononucleares, em paralelo à liberação de IL-1 e TNF- α . Esta metaloprotease foi capaz de induzir a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos, até 48 horas após sua injeção, retornando aos valores basais em 72 horas (FERNANDES et al., 2006). De forma similar, a metaloprotease batroxase da peçonha de *B. atrox* induziu migração de neutrófilos de forma dose-dependente nas primeiras 6 h após sua injeção na cavidade peritoneal de camundongos, com aumento de células mononucleares nos tempos de 24, 48 e 72 horas (DE TONI, 2011).

Comparando as atividades pró-inflamatórias da BpirSP27 e da BpirSP41 com àquelas de uma metaloprotease da classe P-I (ainda não publicada) e de uma fosfolipase A₂ sem atividade catalítica (Lys49 PLA₂, piratoxin-I) (LANDUCCI et al., 2000) também da peçonha de *B. pirajai*, pode-se sugerir que a indução de dor e edema não está diretamente relacionada à classe das serinoproteases, estando estas enzimas provavelmente envolvidas indiretamente na inflamação local causando distúrbios de pressão sanguínea (MATSUI et al., 2000), liberando metaloproteases endógenas (SARAVIA-OTTEN et al., 2004) ou ainda promovendo migração de neutrófilos, como observado no presente estudo.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos revelaram importantes características bioquímicas, funcionais e estruturais de duas serinoproteases distintas da peçonha de *Bothrops pirajai*, possibilitando também uma análise comparativa entre estas enzimas. Embora o objetivo inicial do presente trabalho consistisse na purificação e caracterização de apenas uma serinoprotease de *B. pirajai*, o mesmo foi modificado quando duas prováveis isoformas de massas moleculares consideravelmente diferentes foram encontradas após a etapa cromatográfica de afinidade em Benzamidine Sepharose. Os estudos que vieram a seguir mostraram que as diferenças entre as enzimas iam além do conteúdo de carboidratos, com diversas alterações em suas sequências de aminoácidos que refletiram também em interessantes diferenças funcionais.

A BpirSP27 é uma serinoprotease com massa molecular de 32 kDa por SDS-PAGE e 27 kDa por espectrometria de massas, apresentando uma taxa de N-glicosilação aproximada de 15% de acordo com determinação por SDS-PAGE após tratamento com a enzima deglicosilante PNGase F. É uma enzima ácida, com *pI* próximo de 4,7, capaz de degradar preferencialmente a cadeia B β do fibrinogênio, além de agir moderadamente sobre coágulos de fibrina e de sangue *in vitro* dependendo da dose utilizada e do tempo de incubação. Sua sequência parcial de aminoácidos (com 148 resíduos obtidos) mostrou maior similaridade a sequências de serinoproteases de peçonhas de outros gêneros de serpentes que não *Bothrops*, entre eles *Crotalus*, *Trimeresurus*, *Gloydius* e *Agkistrodon*. Em relação à atividade coagulante, a BpirSP27 apresentou baixo potencial de acordo com sua alta dose coagulante mínima (DCM ~20 μ g). Esta enzima mostrou elevada estabilidade frente a variações de pH e temperaturas, com diminuições significativas apenas para os valores de pH muito ácidos (pH 3,0 e 4,5) e para a temperatura extrema de 100°C. Na presença de inibidores específicos de serinoproteases, como PMSF, benzamidina, leupeptina e aprotinina, a BpirSP27 teve suas atividades significativamente reduzidas, enquanto que o tratamento com inibidores de metaloproteases EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina não surtiu o mesmo efeito. A BpirSP27 ainda mostrou ser capaz de hidrolisar todos os substratos cromogênicos

avaliados, incluindo o S-2251 para plasmina, e em promover agregação de plaquetas lavadas, mesmo na ausência de cálcio.

A BpirSP41 também mostrou ser uma serinoprotease, com massa molecular de 49 kDa por SDS-PAGE e 41 kDa por espectrometria de massas e elevado conteúdo de N-glicanas, ao redor de 42% de acordo com SDS-PAGE após tratamento com PNGase F. Também é uma enzima ácida, com pI próximo de 3,7, capaz de agir sobre as cadeias A α e B β do fibrinogênio e sobre coágulos de fibrina e de sangue *in vitro* de maneira mais potente do que a BpirSP27. A sequência parcial da BpirSP41 (com 128 resíduos de aminoácido obtidos) apresentou maior similaridade a sequências de serinoproteases de outras espécies do gênero *Bothrops*, incluindo *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. leucurus*, *B. jararaca* e *B. insularis*. Em comparação à BpirSP27, a BpirSP41 mostrou ser mais potente também em coagular o plasma humano, com uma DCM de aproximadamente 3,5 μ g, sendo também mais estável frente a pHs e temperaturas extremas. Suas atividades foram diminuídas por inibidores específicos de serinoproteases, embora tenha apresentado menor sensibilidade ao PMSF. A BpirSP41 foi capaz de hidrolisar diversos substratos cromogênicos como S-2238, S-2222, S-2266 e S-2302, porém, diferentemente da BpirSP27, não apresentou ação sobre o substrato S-2251, e teve menor capacidade em promover agregação plaquetária.

Os resultados obtidos sugerem que as diferenças encontradas entre as atividades das serinoproteases de *B. pirajai* devem estar relacionadas principalmente a suas pronunciadas diferenças estruturais, incluindo diferentes sequências de aminoácidos e taxas de glicosilação. Além de importante para a estabilidade das enzimas, a N-glicosilação mostrou ser essencial também para as suas atividades, já que as enzimas deglicosiladas com PNGase F não foram capazes de coagular o plasma humano.

Visto que até o momento poucos estudos investigaram a ação de serinoproteases de peçonhas de serpentes sobre o sistema complemento e processos inflamatórios, o presente trabalho também teve como foco a avaliação das atividades da BpirSP27 e da BpirSP41 sobre estes importantes processos fisiológicos. Os resultados dos ensaios sobre o sistema complemento sugerem que as serinoproteases de *B. pirajai* foram capazes de induzir modulação das VC/VL e VA em diferentes graus, sendo que a BpirSP41 promoveu maior inibição das VC/VL

em comparação à BpirSP27, e ambas tiveram ações inibitórias similares sobre a VA. Estudos mais detalhados utilizando componentes isolados do complemento, como C2, C3, C4 e C5, devem ser realizados para tentar elucidar os efeitos inibitórios destas enzimas sobre o sistema complemento. Em relação aos efeitos pró-inflamatórios, ambas as serinoproteases apresentaram ações discretas sobre processos como a indução de edema e dor, promovendo um pronunciado recrutamento de neutrófilos sem induzir aumento significativo na quantidade total de leucócitos no exsudato inflamatório após 6 e 24 h da administração na cavidade peritoneal de camundongos. Estes resultados sugerem que estas enzimas devem apresentar um papel menor na inflamação causada pela peçonha de *B. pirajai*.

Estudos de proteínas de peçonhas de serpentes podem resultar na utilização direta ou de partes das estruturas destas enzimas na obtenção de modelos sintéticos para a elaboração de novos fármacos. Assim, entender o mecanismo de ação das serinoproteases em induzir efeitos tóxicos e farmacológicos, e caracterizá-las bioquímica e estruturalmente torna-se de suma importância para possibilitar o possível uso futuro destas enzimas em diversas áreas da clínica-médica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ALEXANDER, A.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R.J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon** v. 26, p. 953-960, 1988.
- ALMEIDA, J.O.; FIFE JR., E.H. Quantitatively standardized complement-fixation methods for critical evaluation of antigens prepared from *Trypanosoma cruzi*. **Pan Am. Health Org.** no. 319, 86 p., 1976.
- AMARAL, A. New genera and species of snakes. **Proc. New Engl. Zool. Club.** v. 8, p. 85-105, 1923.
- 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, 1997.
- ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new toxin. **Toxicon** v. 8, p. 907-916, 1989.
- ARGOLO, A.J.S. 2000. *Bothrops pirajai*. In: IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/39902/0>>. Acesso em: 9 fev. 2012.
- AYRES, L.R. **Modulação de eventos da imunidade humoral e celular por venenos brutos e componentes dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai***. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- BALLOW, M.; COCHRANE, C.G. Two anticomplementary factors in cobra venom: hemolysis of guinea pig erythrocytes by one of them. **J. Immunol.** v. 103, p. 944-952, 1969.
- BARBOSA, A.M.; DO AMARAL, R.O.; TEIXEIRA, C.F.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon** v. 42, p. 515-523, 2003.
- BARBOSA, M.D.; GREGH, S.L.; PASSANEZI, E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. **J. Periodontol.** v. 78, p. 2026-2031, 2007.
- BARBOSA, M.D.; STIPP, A.C.; PASSANEZI, E.; GREGHI, S.L. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery: histological analysis. **J. Appl. Oral Sci.** v. 16, p. 310-315, 2008.
- BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D. Families and clans of serine peptidases. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 318, p. 247-250, 1995.

*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023/2002.

BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol. Lat. Am.** v. 11, p. 224-232, 1961.

BARROS, L.C.; FERREIRA, R.S. JR; BARRAVIERA, S.R.; STOLF, H.O.; THOMAZINI-SANTOS, I.A.; MENDES-GIANNINI, M.J.; TOSCANO, E.; BARRAVIERA, B. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. **J. Toxicol. Environ. Health** v. 12B, p. 553-571, 2009.

BELL, W.R. Clinical trials with ancrod. In: PIRKLE, H.; MARKLAND JR, F.S. (Ed). **Hemostasis and Animal Venoms**, New York: Marcel Dekker Inc, 1988, p. 541-551.

BLOMBÄCK, B.; BLOMBÄCK, M.; HESSEL, B.; IWANAGA, S. Structure of N-terminal fragments of fibrinogen and specificity of thrombin. **Nature** v. 215, p. 1445-1448, 1967.

BOFFA, M.C.; BOFFA, G.A. A phospholipase A₂ with anticoagulant activity. II. Inhibition of the phospholipid activity in coagulation. **Biochim. Biophys. Acta** v. 429, p. 839-852, 1976.

BOON, G.D. An overview of hemostasis. **Toxicol. Pathol.** v. 21, p. 170-179, 1993.

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

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

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

BRAUD, S.; LE BONNIEC, B.F.; BON, C.; WISNER, A. The stratagem utilized by the plasminogen activator from the snake *Trimeresurus stejnegeri* to escape serpins. **Biochemistry** v. 41, p. 8478-8484, 2002.

BRAUD, S.; PARRY, M.A.; MAROUN, R.; BON, C.; WISNER, A. The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 1823-1828, 2000b.

CANDURI, F.; MANCUSO, L.C.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; WARD, R.J.; ARNI, R.K. Crystallization of piratoxin I, a myotoxic Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Bothrops pirajai*. **Toxicon** v. 36, p. 547-551, 1998.

CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; RIBEIRO, J.M. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipooxygenase pathway. **Br. J. Pharmacol.** v. 84, p. 551-560, 1985.

CASTRO, H.C.; SILVA, D.M.; CRAIK, C.; ZINGALI, R.B. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? **Biochim. Biophys. Acta** v. 1547, p. 183-195, 2001.

CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; ALBUQUERQUE, M.G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C.R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 61, p. 843-856, 2004.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon** v. 39, p. 1173-1181, 2001.

CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Pharmacological study of oedema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice. **Toxicon** v. 33, p. 31-39, 1995.

CHEN, T.; RAEL, E.D. Purification of M5, a fibrinolytic proteinase from *Crotalus molossus molossus* venom that attacks complement. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 29, p. 789-799, 1997.

CHO, S.Y.; HAHN, B.S.; YANG, Y.K.; KIM, Y.S. Purification and characterization of calobin II, a second type of thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). **Toxicon** v. 39, p. 499-506, 2001.

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

COSTA, J.O.; FONSECA, K.C.; MAMEDE, C.C.; BELETTI, M.E.; SANTOS-FILHO, N.A.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C.; HIRAYAMA, S.N.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; DE OLIVEIRA, F. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon** v. 55, p. 1365-1377, 2010.

CROTT, L.S.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; SILVA, C.L.; BARBOSA, J.E. Interactions of F1 fractions from different strains of *Paracoccidioides brasiliensis* with human complement and with human neutrophils. **Mycopathologia** v. 140, p. 19-27, 1997.

CRUZ, L.S.; VARGAS, R.; LOPES, A.A. Snakebite envenomation and death in the developing world. **Ethn. Dis.** v. 19, p. 42-46, 2009.

- DASCOMBE, W.H.; DUMANIAN, G.; HONG, C.; HEIL, B.V.; LABADIE, K.; HESSEL, B.; BLOMBÄCK, B.; JOHNSON, P.C. Application of thrombin based fibrin glue and non-thrombin based batroxobin glue on intact human blood vessels: evidence for transmural thrombin activity. **Thromb. Haemost.** v. 78, p. 947-951, 1997.
- DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry** v. 30, p. 10363-10370, 1991.
- DE AZEVEDO, W.F. JR; WARD, R.J.; CANDURI, F.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; ARNI, R.K. Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic phospholipase A₂-homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Toxicon** v. 36, p. 1395-1406, 1998.
- DESHIMARU, M.; OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; CHIIJIWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; NIWA, M.; YAMASHINA, I.; HATTORI, S.; OHNO, M. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. **FEBS Lett.** v. 397, p. 83-88, 1996.
- DE TONI, L.G.B. **Batroxase, uma nova metaloprotease da classe PI isolada da peçonha de *Bothrops atrox*: avaliação da atividade funcional.** 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D.V.; CAMPOS, A.C.M.R.; MAGNOLI, F.; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L. Complement activation by animal venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.** v. 14, p. 375-400, 1995.
- DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon** v. 40, p. 659-665, 2002.
- EDGAR, W.; PRENTICE, C.R.M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thromb. Res.** v. 2, p. 85-95. 1973.
- EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur. J. Biochem.** v. 1, p. 80-91, 1967.
- EGGERTSEN, G.; FOHLMAN, J.; SJÖQUIST, J. *In vitro* studies on complement inactivation by snake venoms. **Toxicon** v. 18, p. 87-96, 1980.
- FARIA, L.; ANTUNES, E.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom. **Toxicon** v. 39, p. 825-830, 2001.
- FARID; T.M.; TU, A.T.; EL-ASMAR, M.F. Characterization of cerastobin, a thrombin-like enzyme from the venom of *Cerastes vipera* (Sahara sand viper). **Biochemistry** v. 28, p. 371-377, 1989.

- FARSKY, S.H.; GONÇALVES, L.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; CORREA, A.P.; RUCAVADO, A.; GASQUE, P.; TAMBOURGI, D.V. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. **Mediators Inflamm.** v. 9, p. 213-221, 2000.
- FARSKY, S.H.P.; COSTA-CRUZ, J.W.M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F.P. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. *In vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon** v. 35, p. 85-93, 1997.
- FEINSTEIN, M.B.; FRASER, C. Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. Inhibition by PGE1 and dibutyryl cyclic AMP. **J. Gen. Physiol.** v. 66, p. 561-581, 1975.
- FERNANDES, C.M.; PEREIRA TEIXEIRA, C.F.; LEITE, A.C.; GUTIÉRREZ, J.M.; ROCHA, F.A. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF-alpha and PGE₂-dependent mechanisms. **Br. J. Pharmacol.** v. 151, p. 1254-1261, 2007.
- FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F. Inflammatory effects of BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon** v. 47, p. 549-559, 2006.
- FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon** v. 31, p. 1551-1559, 1993.
- FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. **Toxicon** v. 45, p. 969-985, 2005.
- FRITZINGER, D.C.; BREDEHORST, R.; VOGEL, C.W. Molecular cloning and derived primary structure of cobra venom factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 91, p. 12775-12779, 1994.
- FULY, A.L.; DE MIRANDA, A.L.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochem. Pharmacol.** v. 63, p. 1589-1597, 2002.
- FULY, A.L.; MACHADO, O.L.; ALVES, E.W.; CARLINI, C.R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Thromb. Haemost.** v. 78, p. 1372-1380, 1997.
- GABRIJELCIC, D.; DRUJAN, B.; GUBENSEK, F. Coagulant proteinase from *Bothrops colombiensis* venom. **Toxicon** v. 20, p. 275-278, 1982.
- GALVÃO NASCIMENTO, N.; SAMPAIO, M.C.; AMARAL OLIVO, R.; TEIXEIRA, C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon** v. 55, p. 343-352, 2010.

- GAO, R.; ZHANG, Y.; MENG, Q.X.; LEE, W.H.; LI, D.S.; XIONG, Y.L.; WANG, W.Y. Characterization of three fibrinogenolytic enzymes from Chinese green tree viper (*Trimeresurus stejnegeri*) venom. **Toxicon** v. 36, p. 457-467, 1998.
- GARDINER, E.E.; ANDREWS, R.K. The cut of the clot(h): snake venom fibrinogenases as therapeutic agents. **J. Thromb. Haemost.** v. 6, p. 1360-1362, 2008.
- GASMI, A.; LOUZIR, H.; KAROUI, H.; AYEB, M.; DELLAGI, K. Purification from *Vipera lebetina* (desert adder) venom of a protein that depletes human complement. **Nat. Toxins** v. 2, p. 44-48, 1994.
- GAVEL, Y.; VON HEIJNE, G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. **Protein Eng.** v. 3, p. 433-442, 1990.
- GOMES, M.E.; FABRIS, C.B.; FILHO, J.L.; DREHER, R.; ROSITO, G.A. Antagonistas do receptor plaquetário GPIIb/IIIa. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 46, p. 255-264, 2000.
- GUO, L.Y.; ZHU, H.; ZHU, J.F.; JING, N.H.; FENG, L.; ZHOU, Y.C. Identification of a serine protease with nerve growth promoting activity from snake venom. **Neuroreport** v. 9, p. 3577-3581, 1998.
- GUO, Y.W.; CHANG, T.Y.; LIN, K.T.; LIU, H.W.; SHIH, K.C.; CHENG, S.H. Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a beta-fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). **Protein Exp. Purif.** v. 23, p. 483-490, 2001.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Rev. Biol. Trop.** v. 34, p. 209-214, 1986.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, R.M. (Ed). **Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. Chichester: Wiley, 1997, p. 321-352.
- GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Mol. Pathol.** v. 40, p. 367-379, 1984.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, M.; DÍAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon** v. 33, p. 19-29, 1995b.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, M.; NUNEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Exp. Mol. Pathol.** v. 62, p. 28-41, 1995a.

- GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie** v. 82, p. 841-850, 2000.
- HAAS, P.J.; VAN STRIJP, J. Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. **Immunol. Res.** v. 37, p. 161-175, 2007.
- HADDAD, J.J. On the enigma of pain and hyperalgesia: a molecular perspective. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 353, p. 217-224, 2007.
- HAHN, B.S.; YANG, K.Y.; PARK, E.M.; CHANG, I.M.; KIM, Y.S. Purification and molecular cloning of calobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). **J. Biochem.** v. 119, p. 835-843, 1996.
- HARRIS, J.B.; GRUBB, B.D.; MALTIN, C.A.; DIXON, R. The neurotoxicity of the venom phospholipases A₂, notexin and taipoxin. **Exp. Neurol.** v. 161, p. 517-526, 2000.
- HASSON, S.S.; MOTHANA, R.A.; SALLAM, T.A.; AL-BALUSHI, M.S.; RAHMAN, M.T.; AL-JABRI, A.A. Serine protease variants encoded by *Echis ocellatus* venom gland cDNA: cloning and sequencing analysis. **J. Biomed. Biotechnol.** v. 2010, pii: 134232, 2010.
- HAVT, A.; TOYAMA, M.H.; NASCIMENTO, N.R.F.N.; TOYAMA, D.O.; NOBRE, A.C.L.; MARTINS, A.M.C.; BARBOSA, P.S.F.; NOVELLO, J.C.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.C.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 37, p. 130-141, 2005.
- HE, J.; CHEN, S.; GU, J. Identification and characterization of harobin, a novel fibrino(geno)lytic serine protease from a sea snake (*Lapemis hardwickii*). **FEBS Lett.** v. 581, p. 2965-2973, 2007.
- HEBERT, D.N.; GARMAN, S.C.; MOLINARI, M. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. **Trends Cell. Biol.** v. 15, p. 364-370, 2005.
- HERZIG, R.H.; RATNOFF, O.D.; SHAINOFF, J.R. Studies on a procoagulant fraction of southern copperhead snake venom: the preferential release of fibrinopeptide B. **J. Lab. Clin. Med.** v. 76, p. 451-465, 1970.
- HUMMEL, B.C.W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. **Can. ft. Biochem. Physiol.** v. 37, p. 1393-1399, 1959.
- HUNG, C.C.; CHIOU, S.H. Isolation of multiple isoforms of alpha-fibrinogenase from the Western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*: N-terminal sequence homology with ancrod, an antithrombotic agent from Malayan viper. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 201, p. 1414-1423, 1994.

- ITOH, N.; TANAKA, N.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 3132-3135, 1987.
- IZIDORO, L.F.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.L.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.** v. 14, p. 7034-7043, 2006.
- JIN, Y.; LU, Q.M.; WEI, J.F.; LI, D.S.; WANG, W.Y.; XIONG, Y.L. Purification and characterization of jerdofibrase, a serine protease from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake. **Toxicon** v. 39, p. 1203-1210, 2001.
- KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. **Toxicon** v. 27, p. 955-963, 1989.
- KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; DE SILVA, H.J. Estimating the global burden of snakebite: A literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.** v. 5, e218, 2008.
- KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon** v. 27, p. 613-635, 1989.
- KINI, R.M.; EVANS, H.J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon** v. 28, p. 1387-1422, 1990.
- KIRBY, E.P.; NIEWIAROWSKI, S.; STOCKER, K.; KETTNER, C.; SHAW, E.; BRUDZYNSKI, T.M. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 1. Purification and characterization of the enzyme. **Biochemistry** v. 18, p. 3564-3570, 1979.
- KISIEL, W.; KONDO, S.; SMITH, K.J.; MCMULLEN, B.A.; SMITH, L.F. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 12607-12613, 1987.
- KOH, D.C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 63, p. 3030-3041, 2006.
- KOH, Y.S.; CHUNG, K.H.; KIM, D.S. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. **Toxicon** v. 39, p. 555-560, 2001.
- KOMORI, Y.; NIKAI, T. Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzyme from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.** v. 17, p. 261-277, 1998.

- KOMORI, Y.; NIKAI, T.; OHARA, A.; YAGIHASHI, S.; SUGIHARA, H. Effect of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom of common cantil (*Agkistrodon bilineatus*). **Toxicon** v. 31, p. 257-270, 1993.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANDUCCI, E.C.; DE CASTRO, R.C.; TOYAMA, M.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory oedema induced by the Lys-49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. **Biochem. Pharmacol.** v. 59, p. 1289-1294, 2000.
- LEE, J.W.; SEU, J.H.; RHEE, I.K.; JIN, I.; KAWAMURA, Y.; PARK, W. Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 260, p. 665-670, 1999.
- LEE, W.H.; GONÇALEZ, M.C.; RAMALHEIRA, R.M.; KUSER, P.R.; TOYAMA, M.H.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of *Bothrops pirajai*. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** v. 54, p. 1437-1439, 1998.
- LEITÃO, D.P.; POLIZELLO, A.C.; ROTHCHILD, Z. Coagulation and fibrinolysis in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), a close relative of the guinea-pig (*Cavia porcellus*). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** v. 125, p. 113-120, 2000.
- LIU, S.; SUN, M.Z.; SUN, C.; ZHAO, B.; GREENAWAY, F.T.; ZHENG, Q. A novel serine protease from the snake venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Toxicon** v. 52, p. 760-768, 2008.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J.L.; BON, C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. **Toxicon** v. 36, p. 745-758, 1998.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; SOUZA, A.O.; CRUZ-HOFLING, M.A.; FLORES, C.A.; BON, C. *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon** v. 38, p. 209-221, 2000.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation** v. 17, p. 93-105, 1993.
- LOPES, D.S.; BALDO, C.; OLIVEIRA, C.F.; DE ALCÂNTARA, T.M.; OLIVEIRA, J.D.; GOURLART, L.R.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; CLISSA, P.B.; RODRIGUES, V.M. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. **Toxicon** v. 54, p. 42-49, 2009.

- MACKESSY, S.P. The Field of Reptile Toxinology: Snakes, Lizards, and Their Venoms. In: MACKESSY, S.P. (Ed). **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**, Boca Raton: CRC Press, 2009, p. 3-23.
- MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H.P.B.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R.N.; ALMEIDA, A.P.; SANCHEZ, E.F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** v. 146, p. 565-575, 2007.
- MAHAR, A.; SIIGUR, E.; SIIGUR, J. Purification and properties of a proteinase from *Vipera lebetina* (snake) venom. **Biochim. Biophys. Acta** v. 925, p. 272-281, 1987.
- MAN, D.P.; MINTA, J.O. Purification, characterization and analysis of the mechanism of action of four anti-complementary factors in *Crotalus atrox* venom. **Immunochemistry** v. 14, p. 521-527, 1977.
- MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.; LACHAT, J.J.; DE ARAÚJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon** v. 33, p. 615-626, 1995.
- MANDELBAUM, F.R.; HENRIQUES, O.B. Purification and properties of *Bothrops* protease A. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 104, p. 369-374, 1964.
- MARES-GUIA, M.; SHAW, E. Studies on the active center of trypsin; the binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. **J. Biol. Chem.** v. 240, p. 1579-1585, 1965.
- MARKLAND JR, F.S. Crotalase. **Methods Enzymol.** v. 45, p. 223-236, 1976.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon** v. 36, p. 1749-1800, 1998.
- MARKLAND, F.S.; KETTNER, C.; SCHIFFMAN, S.; SHAW, E.; BAJWA, S.S.; REDDY, K.N.N.; KIRAKOSSIAN, H.; PATKOS, G.B.; THEODOR, I.; PIRKLE, H. Kallikrein-like activity of crotalase, a snake venom enzyme that clots fibrinogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 79, 1688-1692, 1982.
- MARRAKCHI, N.; BARBOUCHE, R.; GUERMAZI, S.; BON, C.; EL AYEB, M. Procoagulant and platelet-aggregating properties of cerastocytin from *Cerastes cerastes* venom. **Toxicon** v. 35, p. 261-272, 1997.
- MARRAKCHI, N.; BARBOUCHE, R.; ZINGALI, R.B.; GUERMAZI, S.; KAROUI, H.; BON, C.; EL AYEB, M. Purification and characterization of two serine-proteases from the venom of *Cerastes cerastes*, cerastocytin and cerastotin. **Toxicon** v. 33, p. 1127-1128, 1995b.

- MARRAKCHI, N.; ZINGALI, R.B.; KAROUI, H.; BON, C.; EL AYEB, M. Cerastocytin, a new thrombin-like platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1244, p. 147-156, 1995a.
- MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon** v. 45, p. 1171-1181, 2005.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1477, p. 146-156, 2000.
- MATSUI, T.; SAKURAI, Y.; FUJIMURA, Y.; HAYASHI, I.; OH-ISHI, S.; SUZUKI, M.; HAMAKO, J.; YAMAMOTO, Y.; YAMAZAKI, J.; KINOSHITA, M.; TITANI, K. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. **Eur. J. Biochem.** v. 252, p. 569-575, 1998.
- MEBS, D. Snake venom composition and evolution of Viperidae. **Kaupia** v. 8, p. 145-148, 1999.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature** v. 454, p. 428-435, 2008.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos no Brasil**. São Paulo: Editora Sarvier, 2003, p. 33-61.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim eletrônico epidemiológico**, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf> Acesso em: 9 fev. 2012.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**, 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/arquivos/vol_ii_reptis.pdf> Acesso em: 9 fev. 2012.
- MOLINA, O.; SERIEL, R.K.; MARTINEZ, M.; SIERRA, M.L.; VARELA-RAMIREZ, A.; RAEL, E.D. Isolation of two hemorrhagic toxins from *Crotalus basiliscus basiliscus* (Mexican west coast rattlesnake) venom and their effect on blood clotting and complement. **Int. J. Biochem.** v. 22, p. 253-261, 1990.
- MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M.C.; NASCIMENTO, N.G.; DA SILVA, H.B.; FERNANDES, C.M.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon** v. 60, p. 12-20, 2012.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr. Pharm. Des.** v. 13, p. 2893-2905, 2007.

MÜLLER-EBERHARD, H.J.; FJELLSTRÖM, K.E. Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C3. **J. Immunol.** v. 107, p. 1666-1672, 1971.

MURAYAMA, N.; SAGUCHI, K.; MENTELE, R.; ASSAKURA, M.T.; OHI, H.; FUJITA, Y.; CAMARGO, A.C.; HIGUCHI, S.; SERRANO, S.M. The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1652, p. 1-6, 2003.

NIEWIAROWSKI, S.; KIRBY, E.P.; BRUDZYNSKI, T.M.; STOCKER, K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. **Biochemistry** v. 18, p. 3570-3577, 1979.

NIEWIAROWSKI, S.; MC LANE, M.A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G.J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Sem. Hematol.** v. 31, p. 289-300, 1994.

NIKAI, T.; OHARA, A.; KOMORI, Y.; FOX, J.W.; SUGIHARA, H. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 318, p. 89-96, 1995.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry** v. 33, p. 1843-1849, 1994.

NOLAN, C.; HALL, L.S.; BARLOW, G.H. Ancrod, the coagulating enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. **Methods Enzymol.** v. 45, p. 205-213, 1976.

NOSE, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; HATTORI, S.; KIHARA, H.; OHNO, M. Purification and characterization of a coagulant enzyme, okinaxobin II, from *Trimeresurus okinavensis* (himehabu snake) venom which release fibrinopeptides A and B. **Toxicon** v. 32, p. 1509-1520, 1994.

O'KEEFE, M.C.; CAPORALE, L.H.; VOGEL, C.W. A novel cleavage product of human complement component C3 with structural and functional properties of cobra venom factor. **J. Biol. Chem.** v. 263, p. 12690-12697, 1988.

OHLER, M.; GEORGIEVA, D.; SEIFERT, J.; VON BERGEN, M.; ARNI, R.K.; GENOV, N.; BETZEL, C. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **J. Proteome Res.** v. 9, p. 2422-2437, 2010.

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

OLIVO, R.A.; TEIXEIRA, C.F.; WALLACE, J.L.; GUTIÉRREZ, J.M.; ZAMUNER, S.R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon** v. 49, p. 670-677, 2007.

OUYANG, C.; HONG, J.S.; TENG, C.M. Purification and properties of the thrombin-like principle of *Agkistrodon acutus* venom and its comparison with bovine thrombin. **Thromb. Diath. Haemorrh.** v. 26, p. 224-234, 1971.

OUYANG, C.; HUANG, T.F. Inhibition of platelet aggregation by 5'-nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Toxicon** v. 21, p. 491-501, 1983.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin-like, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon** v. 38, p. 1087-1100, 2000.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin II, with lys-bradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). **Toxicon** v. 41, p. 559-568, 2003.

PAES-LEME, A.F.; PREZOTO, B.C.; YAMASHIRO, E.T.; BERTHOLIM, L.; TASHIMA, A.K.; KLITZKE, C.F.; CAMARGO, A.C.; SERRANO, S.M. *Bothrops* protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. **J. Thromb. Haemost.** v. 6, p. 1363-1372, 2008.

PARK, D.; KIM, H.; CHUNG, K.; KIM, D.S.; YUN, Y. Expression and characterization of a novel plasminogen activator from *Agkistrodon halys* venom. **Toxicon** v. 36, p. 1807-1819, 1998.

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

PÉREZ, A.V.; RUCAVADO, A.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; GUTIÉRREZ, J.M. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 41, p.12-17, 2008.

PÉREZ, A.V.; SARAIVA, P.; RUCAVADO, A.; SANT'ANA, C.D.; SOARES, A.M.; GUTIÉRREZ, J.M. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Toxicon** v. 49, p. 1063-1069, 2007.

PETRETSKI, J.H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C.P.; ALVES, E.W.; KIPNIS, T.L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 33, p. 1293-1300, 2000.

PHILLIPS, D.; CHARO, I.; PARISE, L.; FITZGERALD, L. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. **Blood** v. 71, p. 831-843, 1988.

PIDDE-QUEIROZ, G.; FURTADO, M.F.; FILGUEIRAS, C.F.; PESSOA, L.A.; SPADAFORA-FERREIRA, M.; VAN DEN BERG, C.W.; TAMBOURGI, D.V. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus. **Mol. Immunol.** v. 47, p. 2537-2544, 2010.

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

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory on behalf of the Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. **Thromb. Haemost.** v. 79, p. 675-683, 1998.

PIRKLE, H.; THEODOR, I. Thrombin-like venom enzymes: structure and function. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 281, p. 165-175, 1990.

PIRKLE, H.; THEODOR, I.; MIYADA, D.; SIMMONS, G. Thrombin-like enzyme from the venom of *Bitis gabonica*. Purification, properties, and coagulant actions. **J. Biol. Chem.** v. 261, p. 8830-8835, 1986.

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

RABINOVITCH, M.; DE STEFANO, M.J. Macrophage spreading in vitro. I. Inducers of spreading. **Exp. Cell Res.** v. 77, p. 323-334, 1973.

RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** v. 111, p. 409-419, 1957.

RAW, I.; ROCHA, M. C.; ESTEVES, M. I.; KAMIGUTI, A. S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 19, p. 333-338, 1986.

REICHL, A.P.; ASSAKURA, M.T.; MANDELBAUM, F.R. Biophysical properties and amino acid composition of *Bothrops* protease A, a proteolytic enzyme isolated from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon** v. 21, p. 421-427, 1983.

RITTNER, H.L.; BRACK, A.; STEIN, C. Pain and the immune system. **Br. J. Anaesth.** v. 101, p. 40-44, 2008.

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

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

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

RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int. J. Exp. Pathol.** v. 79, p. 245-254, 1998.

RUGGERI, Z.M.; MENDOLICCHIO, G.L. Adhesion mechanisms in platelet function. **Circ. Res.** v. 100, p. 1673-1685, 2007.

SAGUCHI, K.; HAGIWARA-SAGUCHI, Y.; MURAYAMA, N.; OHI, H.; FUJITA, Y.; CAMARGO, A.C.; SERRANO, S.M.; HIGUCHI, S. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. **Toxicon** v. 46, p. 72-83, 2005.

SAMSA, G.P.; MATCHAR, D.B.; WILLIAMS, G.R.; LEVY, D.E. Cost effectiveness of ancrod treatment of acute ischaemic stroke: results from the Stroke Treatment with Ancrod Trial (STAT). **J. Eval. Clin. Prac.** v. 8, p. 61-70, 2002.

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.

SANT'ANA, C.D.; BERNARDES, C.P.; IZIDORO, L.F.; MAZZI, M.V.; SOARES, S.G.; FULY, A.L.; ZINGALI, R.B.; MAGRO, A.J.; BRAZ, A.S.K.; FONTES, M.R.M.; STÁBELI, R.G.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie** v. 90, p. 500-507, 2008b.

SANT'ANA, C.D.; TICLI, F.K.; OLIVEIRA, L.L.; GIGLIO, J.R.; RECHIA, C.G.V.; FULY, A.L.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; FRANCO, J.J.; STÁBELI, R.G.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. BjussuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** v. 151, p. 443-454, 2008a.

SANTOS, B.F.; SERRANO, S.M.; KULIOPULOS, A.; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBS Lett.** v. 477, p. 199-202, 2000.

SARAVIA-OTTEN, P.; FRISAN, T.; THELESTAM, M. GUTIÉRREZ, J.M. Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: novel roles for venom proteinases. **Toxicon** v. 44, p. 749-764, 2004.

SEGREST, J.P.; JACKSON, R.L.; ANDREWS, E.P.; MARCHESI, V.T. Human erythrocyte membrane glycoprotein: a re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 44, p. 390-395, 1971.

SELISTRE, H.S.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon** v. 25, p. 1135-1144, 1987.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.** v. 6, p. 1191-1197, 2005.

SERRANO, S.M.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A.; CAMARGO, A.C.; FINK, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur. J. Biochem.** v. 251, p. 845-853, 1998.

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

SERRANO, S.M.; MATOS, M.F.; MANDELBAUM, F.R.; SAMPAIO, C.A. 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, 1993.

SERRANO, S.M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A.; FINK, E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry** v. 34, p. 7186-7193, 1995.

SERRANO, S.M.; SAMPAIO, C.A.; MENTELE, R.; CAMARGO, A.C.; FINK, E. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification and characterization. **Thromb. Haemost.** v. 83, p. 438-444, 2000.

SHIEH, T.C.; KAWABATA, S.; KIHARA, H.; OHNO, M.; IWANAGA, S. Amino acid sequence of a coagulant enzyme, flavoxobin, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J. Biochem.** v. 103, p. 596-605, 1988.

SHIEH, T.C.; TANAKA, S.; KIHARA, H.; OHNO, M.; MAKISUMI, S. Purification and characterization of a coagulant enzyme from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J. Biochem.** v. 98, p. 713-721, 1985.

SHOIBONOV, B.B.; OSIPOV, A.V.; KRYUKOVA, E.V.; ZINCHENKO, A.A.; LAKHTIN, V.M.; TSETLIN, V.I.; UTKIN, Y.N. Oxiagin from the *Naja oxiana* cobra venom is the first repolysin inhibiting the classical pathway of complement. **Mol. Immunol.** v. 42, p. 1141-1153, 2005.

SIIGUR, E.; MAHAR, A.; SIIGUR, J. Beta-fibrinogenase from the venom of *Vipera lebetina*. **Toxicon** v. 29, p. 107-118, 1991.

SILVA-JUNIOR, F.P.; GUEDES, H.L.; GARVEY, L.C.; AGUIAR, A.S.; BOURGUIGNON, S.C.; DI CERA, E.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. **Toxicon** v. 50, p. 18-31, 2007.

SINGH, S.B.; ARMUGAM, A.; KINI, R.M.; KANDIAH, J. Phospholipase A₂ with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbis* venom: protein purification and cDNA cloning. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 375, p. 289-303, 2000.

SMOLKA, M.B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon** v. 36, p. 1059-1063, 1998.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; BORTOLETO, R.K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 387, p. 188-196, 2001.

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

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

STOCKER, K.; BARLOW, G.H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). **Methods Enzymol.** v. 45, p. 214-223, 1976.

STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon** v. 20, p. 265-273, 1982.

STOCKER, K.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom enzymes. In: PIRKLE, H.; MARKLAND, F.S. (Ed). **Hemostasis and Animal Venoms**, v. 7, New York: Marcel Dekker Inc, 1988, p. 67-84.

STURZEBECKER, J.; STURZEBECKER, U.; MARKWARDT, F. Inhibition of batroxobin, a serine proteinase from *Bothrops* snake venom, by derivatives of benzamidine. **Toxicon** v. 24, p. 585-595, 1986.

- SUN, Q.Y.; BAO, J. Purification, cloning and characterization of a metalloproteinase from *Naja atra* venom. **Toxicon** v. 56, p. 1459-1469, 2010.
- SWENSON, S.; MARKLAND, F.S. JR. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon** v. 45, p. 1021-1039, 2005.
- TAN, N.H. Isolation and characterization of the thrombin-like enzyme from *Cryptelytrops purpureomaculatus* venom. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** v. 151, p. 131-136, 2010.
- TANAKA, G.D.; QUEIROZ, G.P.; FURTADO, M.D.; VAN DEN BERG, C.W.; TAMBOURGI, D.V. *Micrurus* snake venoms activate human complement system and generate anaphylatoxins. **BMC Immunol.** v. 13, p. 4-11, 2012.
- TANG, S.S.; ZHANG, J.H.; TANG, B.S.; TANG, Z.H.; LI, H.Z.; YUAN, H.J.; CHUI, S.L.; ZHAO, E.Y. Biochemical and hemostatic mechanism of a novel thrombin-like enzyme. **Thromb. Res.** v. 124, p. 631-639, 2009.
- TARENTINO, A.L.; GÓMEZ, C.M.; PLUMMER, T.H. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. **Biochemistry** v. 24, p. 4665-4671, 1985.
- TATEMATSU, R.; KOMORI, Y.; NIKAI, T. A new thrombinlike enzyme, flavoviridiobin from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (habu). **J. Nat. Toxins** v. 9, p. 327-339, 2000.
- TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon** v. 154, p. 988-997, 2009.
- TEIXEIRA, C.F.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; ZAMUNER, S.F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 100, p. 181-184, 2005.
- TEIXEIRA, C.F.; LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon** v. 42, p. 947-962, 2003.
- TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon** v. 32, p. 419-426, 1994.
- TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; DA SILVA, F.M.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SILVA, F.P. JR.; IZIDORO, L.F.; FULY, A.L.; JULIANO, M.A.; DOS SANTOS, C.R.; MURAKAMI, M.T.; SAMPAIO, S.V.; DA SILVA, S.L.; SOARES, A.M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Arch. Toxicol.** v. 85, p. 1219-1233, 2011.

TENG, C.M.; KO, F.N. A comparison of the platelet aggregation induced by three thrombin-like enzymes of snake venoms and thrombin. **Thromb. Haemost.** v. 59, p. 304-309, 1998.

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

TOKUNAGA, F.; NAGASAWA, K.; TAMURA, S.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; KISIEL, W. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom: identification of isoproteins RVV-V alpha, -V beta, -V gamma and their complete amino acid sequence. **J. Biol. Chem.** v. 263, p. 17471-17481, 1988.

TOYAMA, M.H.; COSTA, P.D.; NOVELLO, J.C.; DE OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; DA CRUZ-HÖFLING, M.A.; MARANGONI, S. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **J. Protein Chem.** v. 18, p. 371-378, 1999.

TOYAMA, M.H.; MANCUSO, L.C.; GIGLIO, J.R.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. **Biochem. Mol. Biol. Int.** v. 37, p. 1047-1055, 1995.

TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; VIEIRA, C.A.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. **J. Protein Chem.** v. 17, p. 713-718, 1998.

TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; WEN-HWA, L.; POLIKARPOV, I.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie** v. 82, p. 245-250, 2000.

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

ULBRICH, H.; ERIKSSON, E.E.; LINDBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 24, p. 640-647, 2003.

VALERIANO-ZAPANA, J.A.; SEGOVIA-CRUZ, F.S.; ROJAS-HUALPA, J.M.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. **Toxicon** v. 59, p. 231-240, 2012.

VAN ARMAN, C.G.; BEGANY, A.J.; MILLER, J.M.; PLESS, H.H. Some details of the inflammation caused by yeast and carragenin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 150, p. 328-333, 1965.

- VARANDA, E.A.; GIANNINI, M.J.S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIEIRA, B. (Ed). **Venenos. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**, Rio de Janeiro: EPUB, 1999, p. 205-223.
- VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. **Biochim. Biophys. Acta** v. 257, p. 11-19, 1972.
- VIEIRA, D.F.; WATANABE, L.; SANT'ANA, C.D.; MARCUSSI, S.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; ARNI, R.K. Purification and characterization of jararassin-I, a thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom. **Acta Biochim. Biophys. Sin.** v. 36, p. 798-802, 2004.
- VILCA-QUISPE, A.; PONCE-SOTO, L.A.; WINCK, F.V.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon** v. 55, p. 745-753, 2010.
- VOGEL, C.W.; FRITZINGER, D.C. Cobra venom factor: Structure, function, and humanization for therapeutic complement depletion. **Toxicon** v. 56, p. 1198-1222, 2010.
- VON ZABERN, I.; PRZYKLENK, H.; DAMERAU, B.; ZIMMERMANN, B. Isolation and properties of a complement inhibitor from *Naja haje* venom, distinct from known anticomplementary factors in cobra venom. **Scand. J. Immunol.** v. 14, 109-120, 1981.
- WAGNER, E.; FRANK, M.M. Therapeutic potential of complement modulation. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 9, p. 43-56, 2010.
- WALPORT, M.J. Complement. First of two parts. **N. Engl. J. Med.** v. 344, p. 1058-1066, 2001a.
- WALPORT, M.J. Complement. Second of two parts. **N. Engl. J. Med.** v. 344, p. 1140-1144, 2001b.
- WANG, Y.M.; WANG, S.R.; TSAI, I.H. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. **Biochem. J.** v. 354, p. 161-168, 2001.
- WARNER, R.L.; MCCLINTOCK, S.D.; BARRON, A.G.; DE LA IGLESIA, F. Hemostatic properties of a venomous protein in rodent dermal injuries. **Exp. Mol. Pathol.** v. 83, p. 241-248, 2007.
- WARNER, R.L.; MCCLINTOCK, S.D.; BARRON, A.G.; DE LA IGLESIA, F.A. Hemostatic properties of a venomous protein in rat organ trauma. **Exp. Mol. Pathol.** v. 87, p. 204-211, 2009.
- WENCEL-DRAKE, J.; BOUDIGNON-PROUDHON, C.; DIETER, M.; CRISS, A.; PARISE, L. Internalization of bound fibrinogen modulates platelet aggregation. **Blood** v. 87, p. 602-612, 1996.

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

WU, W.; GUAN, X.; KUANG, P.; JIANG, S.; YANG, J.; SUI, N.; CHEN, A.; KUANG, P.; ZHANG, X. Effect of batroxobin on expression of neural cell adhesion molecule in temporal infarction rats and spatial learning and memory disorder. **J. Tradit. Chin. Med.** v. 21, p. 294-298, 2001.

YAMAMOTO, C.; TSURU, D.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M.; HATTORI, S.; KIM, S.T. Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. **Immunology** v. 107, p. 111-117, 2002.

YARDUMIAN, D.A.; MACKIE, I.J.; MACHIN, S.J. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. **J. Clin. Pathol.** v. 39, p. 701-712, 1986.

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 jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). **Toxicon** v. 34, p. 807-819, 1996.

ZAMUNER, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; MUSCARA, M.N.; TEIXEIRA, S.A.; TEIXEIRA, C.F. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon** v. 39, p. 1505-1513, 2001.

ZAMUNER, S.R.; TEIXEIRA, C.F. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators Inflamm.** v. 11, p. 351-357, 2002.

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

ZHANG, Y.; WISNER, A.; XIONG, Y.; BON, C. A novel plasminogen activator from snake venom: purification and characterization, and molecular cloning. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 10246-10255, 1995.

ZHU, Z.; LIANG, Z.; ZHANG, T.; ZHU, Z.; XU, W.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. **J. Biol. Chem.** v. 280, p. 10524-10529, 2005.

ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon** v. 45, p. 335-346, 2005.

ZYCHAR, B.C.; DALE, C.S.; DEMARCHI, D.S.; GONÇALVES, L.R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon** v. 55, p. 227-234, 2010.