**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

# Isolamento, caracterização bioquímica e funcional *in vitro* e *in vivo* de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* envolvida no processo de ativação de fatores da cascata de coagulação

**Marco Aurélio Sartim**

**Ribeirão Preto**

**2014**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

# Isolamento, caracterização bioquímica e funcional *in vitro* e *in vivo* de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* envolvida no processo de ativação de fatores da cascata de coagulação

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

Área de Concentração: Toxicologia

**Orientado:** Marco Aurélio Sartim

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

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 18/08/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

**Ribeirão Preto**

**2014**

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.

Sartim, Marco Aurélio

Isolamento, caracterização bioquímica e funcional *in vitro* e *in vivo* de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* envolvida no processo de ativação de fatores da cascata de coagulação. Ribeirão Preto, 2014.

159p.: il. ; 30 cm

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

Orientadora: profa. Dra. Suely Vilela.

1. Hemostasia. 2. Fatores Coagulação. 3. *Bothrops moojeni*.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Marco Aurélio Sartim

Isolamento, caracterização bioquímica e funcional *in vitro* e *in vivo* de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* envolvida no processo de ativação de fatores da cascata de coagulação.

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:_____

**Agradecimentos**

Agradeço,

À Deus pela benção durante todos os caminhos seguidos;

À minha esposa, melhor amiga e companheira para toda a vida Ariandra G. Sartim, quem me apoiou e compartilhou todos os momentos;

À minha família, pai Ademir, Mãe Madalena e irmã Thaisa, a quem devo todo o meu sucesso de vida;

À família Sartim/Travaglia, irmão Rafael, cunhada Tereza e sobrinha Helena, por estarem presente durante esta jornada;

À professora Dra. Suely Vilela, pela orientação durante os 7 anos de pós-graduação na USP-RP. Muito obrigado;

Aos amigos de laboratório Luiz Fernando, Sante, Adélia, Franco, Tiago, Tassia, Norival, Danilo, Anna Laura, Carolina, Marina, Rafhaela e Regina, por toda a boa convivência e amizade que cultivamos durante os anos;

Ao laboratório de Química de Proteínas da FMRP-USP, na supervisão do professor Dr. José Cesar Rosa, pela colaboração durante as análises em espectrometria de massas;

Ao laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitóses, na supervisão da professora Dra. Lucia Helena Facciolli e do Dr. Carlos Artério Sorgi, e ao Laboratório de Imunologia, na supervisão da professora Dra. Fabini Gain Frantz, pela colaboração durante as avaliações inflamatórias;

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida (processo 142499/2010-2).

# RESUMO

SARTIM, M. A. **Isolamento, caracterização bioquímica e funcional *in vitro* e *in vivo* de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* envolvida no processo de ativação de fatores da cascata de coagulação.** 2014. 160f Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Distúrbios de hemostasia são uma das principais manifestações clínicas observadas nos acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. Tendo em vista a importância da ativação de fatores da cascata de coagulação no desenvolvimento da patologia no envenenamento, o presente trabalho descreve o isolamento e a caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease capaz de induzir a ativação de fatores de coagulação, a partir da peçonha de *Bothrops moojeni*. A metaloprotease foi isolada por três etapas cromatográficas utilizando colunas de exclusão molecular (Sephacryl S-200), interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose) e troca aniônica (ES 502N). A protease isolada, denominada moojenactivase, é uma glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 89 kDa e ponto isoelétrico de 4,92, sendo composta por três cadeias com massas de 66; 17 e 14 kDa, ligadas por pontes dissulfeto. A determinação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas evidenciou grande identidade sequencial com outras metaloproteases, indicando a presença dos domínios metaloprotease, desintegrina-like e lectinas-like e classificando-a como uma protease da classe PIIId. Funcionalmente, a moojenactivase foi capaz de induzir a cogulação de plasma humano pela ativação dos fatores II (protrombina) e X da cascata de coagulação, gerando α-trombina e fator X ativado, respectivamente. A protease apresentou atividade fibrinogenolítica, especialmente sobre a cadeia α da molécula de fibrinogênio, porém não foi capaz de induzir a formação do coágulo de fibrina pela ativação deste. A moojenactivase foi parcialmente inibida quando incubada em condições de pH entre 3,5 e 5,0 e em pH 9,0, além de temperaturas acima de 60ºC, bem como na presença de ions $Cu^{2+}$, além dos inibidores EDTA, SDS, DTT e soro anti-ofídico crotalico/botrópico. A protease induziu agregação plaquetária e não apresentou atividades fibrinolítica e hemorrágica. Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) tratadas com a protease foram capazes de produzir TNF-α assim como expressar fator tecidual (Fator III da coagulação) na forma ativa, fazendo com que essas células apresentassem caráter procoagulante. Com o objetivo avaliar os efeitos nos parâmetros hematológicos *in vivo,* a moojenactivase foi administrada em ratos (3µg/Kg) onde foi observado que a protease foi capaz de prolongar o tempo de sangramento dos animais e induzir a diminuição do número de plaquetas sanguíneas, caracterizando um quadro de trombocitopenia. Ainda, o plasma dos animais administrados com a moojenactivase apresentaram valores elevados do tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcialmente ativada, assim como redução na concentração de fibrinogênio. Na análise dos parâmetros da série branca, foi observado aumento leucocitário na circulação, com predominância de neutrófilos até 3h após a administração, indicando a instalação de um quadro inflamatório. Com relação à análise da série vermelha, a moojenactivase não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros estudados. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram, pela primeira vez, o isolamento de uma metaloprotease da classe P-IIId da peçonha de *Bothrops moojeni* capaz de atuar sobre diferentes

eventos do processo hemostático, sendo essa ação prócoagulante responsável pelo quadro de incoagulabilidade sanguínea em animais. Os dados gerados podem auxiliar no entendimento dos distúrbios de coagulação em pacientes envolvidos em acidentes por serpentes da espécie *Bothrops moojeni*, levando ao melhor direcionamento na terapia anti-ofídica. Ainda, a função da moojenactivase sobre componentes biológicos credencia a molécula para uma possível aplicação biotecnológica em processos que envolvem o sistema hemostático.

**Palavras chave:** *Bothrops moojeni*, metaloprotease, ativador de fator de coagulação, fator X, protrombina, fator tecidual, prócoagulante, agregação plaquetária, processo inflamatório.

## ABSTRACT

SARTIM, M. A. **Purification, biochemical and functional characterization *in vitro* and *in vivo* of a metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom involved in the activation of coagulation factors.** 2014. 160f. Thesis (doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Haemostasis disorders are a major clinical manifestation induced by *Bothrops* snake envenomations. Considering the relevance of the activation of coagulation factors during the envenomation pathophysiology, the present work describes, for the first time, the isolation and functional and biochemical characterization of a coagulation factor activator metalloprotease from *Bothrops moojeni* snake venom. The protease was purified by three chromatographic procedures using size exclusion (Sephacryl S-200), hydrophobic interaction (Phenyl Sepharose) and anion exchange (ES 502N) chromatographies. The isolated protease, named moojenactivase, is a glycoprotein with molecular mass of approximately 89 kDa by SDS-PAGE, and composed of 66 kDa, 17 kDa and 14 kDa disulfide linked chains, with pI of 4,92. The amino acid sequence determination of tryptic peptides from moojenactivase by mass spectrometry presented fragments with high identity to snake venom metalloproteases, confirming the presence of the metalloprotease, disintegrin-like and lectin-like domains, which allowed its classification as a PIIId class snake venom metalloprotease. Regarding its functional properties, the protease was capable to induce human plasma coagulation by inducing activation of coagulation factors II and X, forming α-thrombin and factor X activated, respectively. Also, moojenactivase presented fibrinogenolitic activity, by cleaving preferentially α-chain of fibrinogen, however was not capable to induce the formation of fibrin clot from fibrinogen. The enzyme stability was assessed and showed that moojenactivase presented a reduced functional activity when preincubated in pH values ranging from 3,5 to 5,0 and at pH 9,0, and in temperature conditions over 60ºC. $Cu^{2+}$ ions and inhibitors such as EDTA, SDS, DTT and crotalic/bothropic antiophidian serum reduced the protease activity. Moojenactivase induced platelet aggregation, but no fibrinolytic and haemorrhage activities. In order to evaluate the stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), cells were treated with the protease and we observed the release of proinflammatory cytokine TNF-α and expression of active Tissue Factor (coagulant factor III), inducing a procoagulant state on PBMC. In order to evaluate *in vivo* haematological effects, the protease (3 µg/Kg) was administered in rat (i.v.) and was observed that moojenactivase induced a prolonged bleeding time and reduced platelet counting (indicating a thrombocytopenia state). Moreover, the evaluation of the hemostasis parameters was assessed by the the prothrombin time and activated partial thromboplastin time assays and showed a prolonged clot time on both tests, and also a decrease in fibrinogen plasma levels. The leukogram analysis showed an increase in the circulating leukocyte number up to 3 hours after moojenactivase administration, composed predominantly of neutrophils. However, parameters envolving red cells shows that the protease do not affect. The results obtained in the present work show, for the first time, the isolation of a PIIId class metalloprotease from *Bothrops moojeni* snake venom involved on the activation of several hemostatic events, inducing a pro coagulant activity and leading to blood unclottable state in experimental animals. These data can assit in understanding coagulation disturbs in

patients involved in *Bothrops moojeni* envenomation and leading to a better anti ophidic therapy guidance. Moreover, moojenactivase functional activities accredits this protease as a possible molecular instrument applied on biotechnological prospect related to the hemostasis.

**Keywords:** *Bothrops moojeni*, metalloproteases, coagulation factor activators, factor X, prothrombin, Tissue factor, procoagulant, platelet aggregation, inflammatory process.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das espécies gênero *Bothrops* no Brasil ..... 2

Figura 2. Esquema representativo da classe das metaloproteases da peçonha de serpentes..... 6

Figura 3. Acidentes botrópicos ..... 7

Figura 4. Modelo clássico da cascata de coagulação: vias intrínseca e extrínseca .. 12

Figura 5. Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares ..... 14

Figura 6. Fatores de coagulação dependentes de vitamina K ..... 17

Figura 7. Representação da estrutura primária da molécula de protrombina..... 18

Figura 8. Representação esquemática da ativação da protrombina humana..... 20

Figura 9. Representação da estrutura primária da molécula de Fator X ..... 21

Figura 10. Representação da ativação do Fator X ..... 22

Figura 11. Reação amidolítica..... 45

Figura 12. Cálculo da atividade amidolítca a partir da curva de ativação de fatores da coagulação ..... 46

Figura 13. Cromatografia de exclusão molecular sephacryl S-200 e análise SDS-PAGE das frações ..... 66

Figura 14. Atividade Caseinolítica e Ativação de Protrombina das frações da cromatografia Sephacryl S-200 ..... 67

Figura 15. Cromatografia em Phenyl Sepharose e análise SDS-PAGE das frações ..... 69

Figura 16. Atividade caseinolítica e Ativação de Protrombina das frações da cromatografia Phenyl Sepharose ..... 70

Figura 17. Cromatografia troca aniônica em coluna ES 502 N e análise SDS-PAGE das frações ..... 72

Figura 18. Atividade caseinolítica e Ativação de Protrombina das frações da cromatografia ES-502N ..... 73

Figura 19. Análise molecular e avaliação grau de pureza ..... 77

Figura 20. Alinhamento múltiplo dos peptídeos trípticos da moojenactivase ..... 80

Figura 21. Alinhamento múltiplo fragmentos moojenactivase x sequênciancias completas ..... 84

Figura 22. Estabilidade pH e temperatura sobre a ativação de protrombina pela moojenactivase ..... 87

Figura 23. Avaliação do efeito de íons na atividade da moojenactivase sobre a ativação de protrombina ..... 89

Figura 24. Avaliação do efeito de inibidores na atividade da moojenactivase sobre a ativação de protrombina ..... 90

Figura 25. Análise em SDS-PAGE dos fragmentos proteolíticos da Ativação de Protrombina e quantificação da Trombina formada ..... 94

Figura 26. Análise em SDS-PAGE dos fragmentos proteolíticos da Ativação do Fator X e quantificação do Fator Xa formado ..... 96

Figura 27. Obtenção do Fator Xa ..... 98

Figura 28. Atividade fibrinogenolítica ..... 100

Figura 29. Atividade coagulante sobre plasma normal e deficiente em fator X e obtenção da dose coagulante mínima ..... 102

Figura 30. Atividade fibrinolíticia ..... 103

Figura 31. Atividade de agregação plaquetária com solução de plaquetas lavadas ..... 104

Figura 32. PBMC tratados com moojenactivase: avaliação viabilidede celular e atividade procoagulante das células ..... 106

Figura 33. Detecção do Fator Tecidual e TNF-α por ELISA ..... 108

Figura 34. Atividade hemorrágica local ..... 109

Figura 35. Tempo de sangramento ..... 110

Figura 36. Contagem de leucócitos totais e diferencial ..... 112

Figura 37. Contagem de Plaquetas ..... 113

Figura 38. Avaliação parâmetros de coagulação ..... 115

Figura 39. Avaliação dos parâmetros da série vermelha ..... 116

# LISTA DE TABELAS

Tabela I. Análise de recuperação proteica e funcional: ES-502N fração EP-IV ..... 74

Tabela II. Sequência de aminoácidos obtida dos fragmentos trípticos internos da moojenactivase ..... 78

Tabela III. Ativação zimogênios que participam da coagulação ..... 91

Tabela IV. Coagulação fibrinogênio ..... 100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP - Atividade de Ativação de Protrombina

ACN – acetonitrila

ADP - adenosina-difosfato

Ambic - tampão bicarbonato de amônio

AT – anti-trombina

BCA - método do ácido bicinchoninico

BSA - albulmina de soro bovino

CA-B - Carinactivase-B

CAPM - cininogênio de alto peso molecular

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CHCM - Concentração Hemoglobina Corpuscular Média

CIVD – coagulação intravascular disseminada

CL – cadeia leve

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CP – cadeia pesada

CRD – domínio de reconhecimento de carboidrato

D.O. – densidade ótica

EGF-like - Fator de Crescimento Epidermal

EGTA - Ácido bis-(aminoetil)glicoléter-tetracético

Fib – fibrinogênio humano

FT – fator tecidual

Gla - ácido γ-carboxiglutâmico

Glu – ácido glutâmico

GPIb - glicoproteína Ib

HCM – hemoglobina cospuscular média

i.p. – intra peritoneal

i.v. – intra venosa

LAAOs - L-aminoácido oxidases

LPS – lipopolissacarídeo

MooA - moojenactivase

PBMC - células mononucleares de sangue periférico

PBMC – leucócitos mononucleares

PBS – tampão fosfato salina

PC - pré-calicreína

PCA – proteína C ativada

PDF – produtos de degradação da fibrina

PL – plaquetas lavadas

$PLA_2$ - fosfolipases $A_2$

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonila

PPP – plasma pobre em plaquetas

PSA – proteína S ativada

PTH-aminoácidos - aminoácidos phenylthyoidantoina derivados

PVDF - fluoreto de polivinilideno

SBF – soro bovino fetal

SDS - dodecil sulfato de sódio

SER – sistema retículo endotelial

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVMPs – metaloproteases da peçonha de serpentes

TCA – ácido tricloro acético

TFPI - inibidor da via do fator tecidual

TMB – tetrametilbenzidina

TP – tempo de protrombina

TPA - ativador tecidual do plasminogênio

TTPa - tempo de tromboplastina parcialmente ativada

VCM - Volume Corpuscular Médio

VICC – Coagulopatia de consumo de fatores induzida por veneno

vW - fator vonWillebrand

**SUMÁRIO**

**RESUMO**.....i
**ABSTRACT**.....iii
**LISTA DE FIGURAS**.....v
**LISTA DE TABELAS**.....vii
**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**.....viii

**1 INTRODUÇÃO**.....1
1.1 Composição da peçonha de serpentes botrópicas.....2
1.2 Metaloproteases.....4
1.3 Acidentes botrópicos.....6
1.4 Fisiologia da hemostasia.....8
1.4.1 Hemostasia primária: eventos vasculares e formação do tampão plaquetário...8
1.4.2 Hemostasia secundária: coagulação.....9
1.4.2.1 Modelo Clássico da Cascata de Coagualção.....9
1.4.2.2 Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares.....12
1.4.2.3 Fatores de Coagulação dependentes de vitamina-K.....15
1.4.3 Hemostasia Terciária: fibrinólise.....22
1.5 Envolvimento de peçonhas ofídicas no processo de hemostasia.....23
1.5.1 Toxinas que atuam na hemostasia.....23
1.5.1.1 Toxinas que atuam na função plaquetária.....23
1.5.1.2 Toxinas que atuam sobre fatores da coagulação sanguínea.....24
1.5.2 Coagulopatias causadas por acidentes ofídicos.....27
1.6 Aspectos gerais e toxinológicos da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*.....28

**2 OBJETIVOS**.....32
2.1 Objetivo geral.....32
2.2 Objetivos específicos.....32

**3 MATERIAIS E MÉTODOS**.....35
3.1 Materiais.....35
3.1.1 Peçonha de *Botrops moojeni*.....35
3.1.2 Amostras de sangue humano periférico.....35
3.1.3 Animais.....35

3.2 Métodos....36
3.2.1 Purificação de uma metaloprotease ativadora de protrombina a partir da peçonha de *Bothrops moojeni*....36
3.2.1.1 Cromatografia de exclusão molecular....36
3.2.1.2 Cromatografia por interação hidrofóbica....36
3.2.1.3 Cromatografia de troca aniônica....37
3.2.2 Determinação da concentração proteica....38
3.2.2.1 Método da medida da absorbância a 205/280 nm....38
3.2.2.2 Método do BCA....38
3.2.3 Avaliação do grau de homogeneidade da moojenactivase por cromatografia em coluna C-18....39
3.2.4 Caracterização Bioquímica....39
3.2.4.1 SDS-PAGE....39
3.2.4.2 Focalização Isoelétrica....40
3.2.4.3 Sequenciamento dos peptídeos trípticos da moojenactivase por espectrometria de massas....41
3.2.4.3.1 Hidrólise tripsínica *in situ*....41
3.2.4.3.2 MALDI-ToF-ToF....42
3.2.4.3.3 ESI Q-ToF....42
3.2.4.3.4 Identificação dos peptídeos obtidos utilizando o software MASCOT....43
3.2.4.4 Análise *in silico*....43
3.2.4.5 Avaliação da presença de glicosilação....43
3.2.5 Atividades Funcionais *in vitro*....44
3.2.5.1 Atividade proteolítica sobre caseína....44
3.2.5.2 Atividade de ativação de fatores da cascata de coagulação....44
3.2.5.2.1 Atividade amidolítica....44
3.2.5.2.1.1 Ensaio de estabilidade e efeitos de íons e inibidores sobre a ativação de protrombina pela moojenactivase....47
3.2.5.2.1.2 Propriedades enzimáticas da moojenactivase....48
3.2.5.2.2 Atividade proteolítica sobre Protrombina, Fator X e Fibrinogênio....51
3.2.5.2.3 Análise da sequência N-terminal de aminoácidos a partir de fragmentos proteolíticos da Protrombina e Fator Xa....51
3.2.5.3 Atividade coagulante....52
3.2.5.3.1 Ensaio de coagulação plasmática....52
3.2.5.3.2 Ensaio de atividade coagulante sobre fibrinogênio....54
3.2.5.4 Atividade Fibrinolítica....54
3.2.5.5 Agregação plaquetária....55

3.2.5.6 Estimulação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) .....56
3.2.5.6.1 Obtenção de leucócitos mononucleares de sangue humano periférico .....56
3.2.5.6.2 Avaliação do potencial citotóxico de PBMC tratados com moojenactivase .....57
3.2.5.6.3 Estimulação de PBMC com moojenactivase .....58
3.2.5.6.4 Atividade pró coagulante dos PBMC tratados com a protease isolada .....58
3.2.5.6.5 Detecção da citocina proinflamatória TNF-α e Fator Tecidual.....59
3.2.6 Atividades Biológicas *in vivo* .....60
3.2.6.1 Atividade hemorrágica local .....60
3.2.6.2 Alterações hemostáticas e hematológicas .....60
3.2.6.1.1 Tempo de sangramento .....61
3.2.6.2.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos e hemostáticos .....61
3.2.7 Análise estatística .....63

**4 RESULTADOS.....64**
4.1 Purificação de uma protease ativadora de protrombina a partir da peçonha de *Bothrops moojeni* .....64
4.1.1 Cromatografia em Sephacryl S-200 .....64
4.1.2 Cromatografia em Phenyl Sepharose.....68
4.1.3 Cromatografia de troca aniônica ES502 N e obtenção de uma protease ativadora de protrombina .....71
4.2 Caracterização Bioquímica.....75
4.2.1 Avaliação grau de pureza e análises bioquímicas da fração EP-IV .....75
4.2.2 Análise da estrutura primária da moojenactivase: sequenciamento de aminoácidos dos fragmentos trípticos .....78
4.3 Avaliação funcional *in vitro* .....86
4.3.1 Análise de estabilidade e efeito de íons e inibidores na capacidade de ativação de protrombina .....86
4.3.1.1 Estabilidade .....86
4.3.1.2 Efeito de íons .....88
4.3.1.3 Efeito de inibidores .....90
4.3.2 Avaliação da atividade sobre fatores envolvidos na hemostasia: Ativação de fatores da coagulação, análise molecular dos produtos e avaliação enzimática.....91
4.3.2.1 Atividade Amidolítica de Ativação de zimogênios da cascata de coagulação .....91
4.3.2.2 Efeito da capacidade de ativação de Protrombina e Fator X: análise dos produtos de proteólise formados e determinação da atividade específica .....92
4.3.2.3 Atividade Fibrinogenolítica e formação coágulo fibrina .....99

4.3.3 Atividade coagulante sobre plasma humano normal e deficiente em Fator X ..101
4.3.4 Atividade Fibrinolítica .....103
4.3.5 Agregação plaquetária .....104
4.3.6 Estimulação de leucócitos mononucleares de sangue periférico (PBMC).....105
4.4 Atividades funcionais *in vivo*.....109
4.4.1 Atividade hemorrágica local .....109
4.4.2 Avaliação de alterações hemostáticas .....110
4.4.2.1 Tempo de sangramento .....110
4.4.2.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos .....111

**5 DISCUSSÃO .....117**
5.1 Isolamento da moojenactivase .....117
5.2 Caracterização Bioquímica.....119
5.2.1 Análise bioquímica da moojenactivase.....119
5.2.2 Sequenciamento de digestos trípticos da moojenactivase .....121
5.3 Caracterização Funcional *in vitro* .....122
5.3.1 Estabilidade e efeitos de íons e inibidores sobre a ativação de protrombina .122
5.3.2 Moojenactivase ativa os fatores II e X da cascata de coagulação .....126
5.3.3 Produção de Fator X ativado pela moojenactivase .....129
5.3.4 Atividade fibrinogenolítica.....130
5.3.5 Moojenactivase induz atividade pró coagulante sobre plasma humano.....131
5.3.6 Moojenactivase não induz fibrinólise direta .....132
5.3.7 Indução da agregação plaquetária pela moojenactivase .....133
5.3.8 Moojenactivase induz efeitos pró coagulantes pela estimulação de PBMC: produção de TNF-α e Fator Tecidual .....135
5.4 Caracterização Funcional *in vivo*.....137
5.4.1 Moojenactivase não induz hemorragia local.....137
5.4.2 Moojenactivase induz alterações nos parâmetros hemostáticos e leucocitário .....138

**6 CONCLUSÃO .....142**

**7 REFERÊNCIAS.....145**

# 1 INTRODUÇÃO

No Brasil existem cerca de 366 espécies de serpentes classificadas em 78 gêneros e reunidas em 10 famílias, sendo as serpentes peçonhentas correspondendo a 15% das espécies e pertencentes a duas famílias: família Viperidae, abrangendo os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*; e a família Elapidae, correspondendo aos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (CARDOSO, 2003; FENWICK et al., 2009; BÉRNILS & COSTA, 2011).

Fenwick e colaboradores (2009) realizaram estudos através de análises morfológicas, filogenéticas e moleculares das espécies de serpentes das famílias Elapidae e Viperidae e propuseram uma nova classificação. Dentre as principais mudanças taxonômicas, as espécies do gênero *Bothrops*, anteriormente representadas por cêrca de 26 espécies, estão atualmente distribuídas em cinco gêneros: *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis*. Segundo a nova classificação, o gênero *Bothropoides* é representado pelas espécies *Bothropoides alcatraz, B. diporus, B. erythromelas, B. insularis, B. jararaca, B. lutzi, B. marmoratus, B. mattogrossensis, B. neuwiedi, B. pauloensis* e *B. pubescens. O* gênero *Rhinocerophis* compreende as espécies *R. alternatus, R. fonsecai, R. cotiara* e R. *itapetiningae*. Já os gêneros *Bothriopsis* e *Bothrocophias* são compostos pelas espécies *Bothriopsis bilineata* e *B. taeniata* e *Bothrocophias hyoprora*, respectivamente.

As serpentes do gênero *Bothrops*, composto pelas espécies *Bothrops atrox*, *B. brazili*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, *B. muriciensis* e *B. pirajai*, estão distribuídas em todo o território brasileiro. Algumas espécies apresentam maior importância por sua extensa distribuição geográfica (e consequentemente apresentam uma maior incidência nos casos de acidentes ofídicos), como por exemplo, a *B. atrox* nas regiões de floresta amazônica, a *B. jararacussu* nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste e a *B. moojeni* nas regiões Centro Oeste e Sudeste, com ocorrência também no Nordeste (Fig. 1) (MALGAREJO, 2003).

**Figura 1. Distribuição das espécies gênero *Bothrops* no Brasil.**

**Fonte:** MALGAREJO (2003).

## 1.1 Composição da peçonha de serpentes botrópicas

A peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* é composta por diferentes componentes, sendo as moléculas de caráter proteico responsável por mais de 90% do peso seco da peçonha. As frações não-protéicas são compostas por carboidratos, lipídeos, metais, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres. O conteúdo proteico compreende uma grande variedade de enzimas como fosfolipases $A_2$, L-aminoácido oxidase, hialuronidases, metalo e serinoproteases, entre outras proteínas não-enzimáticas como desintegrinas e lectinas-like (QUEIROZ et al., 2008).

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação peptídica sobre substratos proteicos. A ação proteolítica sobre proteínas presentes na membrana basal endotelial e em fatores que atuam na coagulação sanguínea desencadeiam diversos efeitos biológicos (MARKLAND & SWENSON, 2013; SERRANO, 2013). As proteases isoladas da peçonha de serpentes podem pertencer a duas classes:

1- As metaloproteases que, na sua maioria, são enzimas que requerem íons zinco para sua função proteolítica, na qual a estabilidade intramolecular deste íon é coordenado pela interação com resíduos de histidina, glutamato e glicina que formam o sítio catalítico (Fox & Serrano, 2008);
2- As serinoproteases, que são definidas por atuarem por um mecanismo catalítico comum, apresentando os resíduos de aminoácido serina,

histidina e ácido aspártico altamente reativos (Serina 195, His 57, Asp 102) (SERRANO, 2013).

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas, que catalisam a deaminação oxidativa estereoespecífica de um substrato L-aminoácido para um α-cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio. Essa enzima apresenta grande importância com realão a toxicidade da peçonha sobre a vítima, possivelmente pela geração de peróxido de hidrogênio (DU & CLEMETSON, 2002).

Presentes em várias peçonhas, as enzimas fosfolipases $A_2$ ($PLA_2$) catalisam a hidrólise da ligação éster do carbono 2 dos fosfolipídeos. Além da atividade enzimática, as $PLA_2$ podem apresentar outros efeitos farmacológicos como: miotóxicos, cardiotóxicos, neurotóxicos e hemolíticos (HUANG & GOPALAKRISHNAKONE, 1996; PETROVA et al., 2009; LI et al., 2012; Haris & Scott-Davey, 2013; LANDUCCI et al., 2013).

As desintegrinas-like (ou desintegrinas-símile) compõem uma classe de toxinas representadas por polipeptídeos de baixo peso molecular encontradas na peçonha de duas formas: na forma livre; e na forma associada a uma molécula de metaloprotease (domínio desintegrina). Funcionalmente, essa classe de toxinas interagem com integrinas do tipo $\alpha_2\beta_1$ atuando como antagonistas de receptores de integrinas (CALVETE, 2013).

Diversas lectinas isoladas da peçonha de serpentes foram descritas, as quais podemos citar duas classes:

- As lectinas do tipo-C (dependentes de íons cálcio) ligantes de galactose, ou lectinas verdadeiras, são proteínas de caráter não enzimático capazes de interagir não covalentemente a resíduos específicos de carboidratos através do domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD do inglês *Carbohydrate Recognition Domain*) presente nessa molécula. São proteínas homodiméricas (com monômero de aproximadamente 14 kDa) ligadas por pontes dissulfeto, e apresentam atividade de interação a glicoconjugados podendo induzir aglutinação de eritrócitos e processos inflamatórios (MENDONÇA-FRANQUEIRO et al., 2011);
- As lectinas-like (ou lectinas-símile) são proteínas compostas por αβ heterodímeros de aproximadamente 14 kDa e 18 kDa, respectivamente, podendo formar oligomerizações gerando moléculas de alto peso molecular variando de 50 à 100 kDa. Essas moléculas diferenciam-se das lectinas

verdadeiras por não serem capazes de interagir com carboidratos e são chamadas dessa forma por apresentarem homologia sequencial (15 a 40%) com o CRD. As lectinas-like atuam em diversos processos patológicos como distúrbios de hemostasia, sendo as glicoproteínas de receptores de membrana celulares e plaquetárias, além de fatores da cascata de coagulação, os principais alvos dessas toxinas (EBLE & ARLINGHAUS, 2012).

Segundo estudos realizados por Guércio *et al*. (2006), diversos fatores influenciam na composição da peçonha dessas serpentes, dentre eles, o habitat, a alimentação e a idade do animal. Assim, a atuação dessas moléculas biologicamente ativas são de fundamental importância no processo de captura e digestão de presas ou no processo fisiopatológico dos acidentes ofídicos frente a seres humanos, por desencadearem diversos efeitos biológicos (CARDOSO *et al*., 2003).

**1.2 Metaloproteases**

Metaloproteases são enzimas dependentes de íons metálicos para exercer sua função catalítica de hidrólise da ligação peptídica entre resíduos de aminoácidos de uma proteína. As SVMPs (do inglês *Snake Venom Metalloproteases*) compõem uma importante classe de toxinas presente nas peçonhas de serpentes, representando um pouco mais de 32% da composição de toxinas em peçonhas de serpentes da família Viperidae, indicando um importante papel na fisiopatologia do envenenamento. As SVMPs estão envolvidas em efeitos biológicos como modulação do processo hemostático, indução de resposta inflamatória, efeitos cardiovasculares, hemorrágico e miotóxico, dentre outros (FOX & SERRANO, 2008).

Uma classificação das SVMPs foi proposta por Fox e Serrano (2008), a qual é baseada na estrutura, nas modificações pós-transducional e no processamento intracelular das proteases, além de levar em consideração os domínios presentes na molécula. As metaloproteases de peçonha de serpentes foram agrupadas em três principais grupos, de PI a PIII, com possíveis subgrupos (Fig. 2). A classe PIa, respresenta as SVMPs que possuem somente o domínio metaloprotease, o qual apresenta a região catalítica HEXXHXXGXXH altamente conservada entre as proteínas dessa classe. A classe PII é aquela que possui além do domínio metaloprotease, o domínio desintegrina-símile RGD, e foi subdividida em “a”, “b”, “c”,

“d”, e “e”; A classe PIIa é expressa com o domínio desintegrina, porém após modificações pós-translacional essas moléculas sofrem um processamento proteolítico, o qual libera o domínio desintegrina-like; a classe PIIb possui o domínio desintegrina como parte da estrutura da proteína sem sofrer proteólise; a classe PIIc é a forma homodimérica da PIIb; a classe PIId representa um precursor que também passa pelo processamento proteolítico e libera desintegrinas homodiméricas; e a classe PIIe compreende metaloproteases que além de apresentarem processos proteolíticos, liberam domínio heterodimérico desintegrina-like RGD. A classe PIII representa as metaloproteases compostas pelos domínios metaloprotease, desintegrina-like e um domínio rico em cisteína, podendo ainda apresentar o domínio lectina-like. As proteases dessa classe podem ser subdivididas em quatro subgrupos: na classe PIIIa, os domínios desintegrina-like e rico em cisteína não são processados e fazem parte da molécula junto ao domínio metaloprotease; na PIIIb, estes domínios são processados e considerados livres; a classe PIIIc é a forma dimérica da PIIIa; e a classe PIIId contém ainda, além dos domínios metaloprotease, desintegrina-like e rico em cisteína, um domínio lectina-like (composto por um heterodímero) ligados por pontes dissulfeto à cadeia principal (Fig. 2) (FOX & SERRANO, 2008).

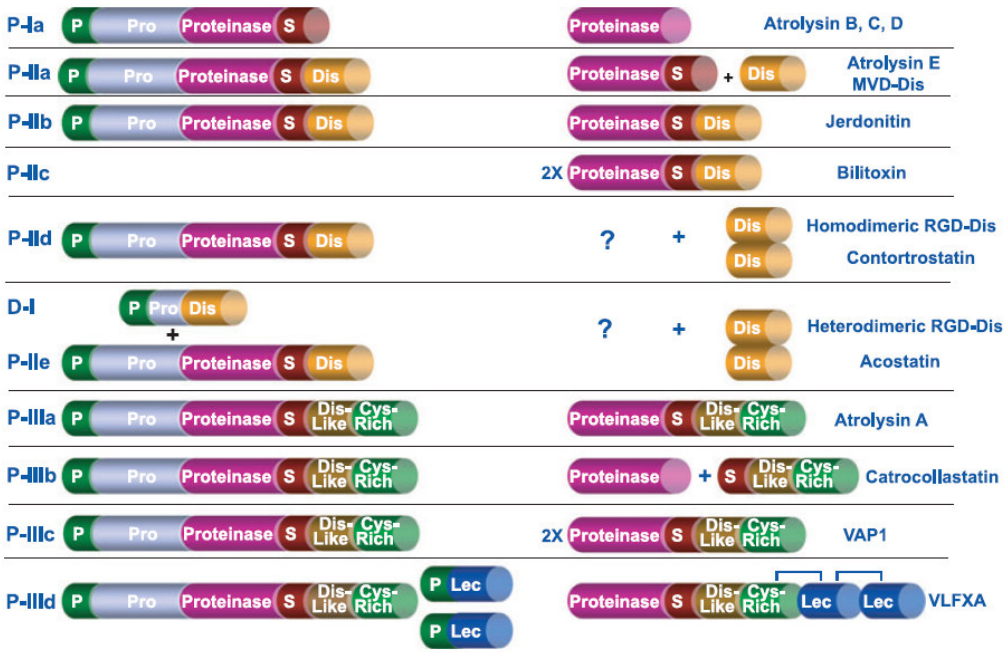



**Figura 2. Esquema representativo da classe das metaloproteases da peçonha de serpentes.** Interrogações (?) na figura indicam que o produto processado ainda não foi identificado na peçonha.

**Fonte:** FOX &SERRANO (2008).

## 1.3 Acidentes botrópicos

Acidentes ofídicos envolvendo serpentes peçonhentas são decorrentes da inoculação da peçonha, produzida por glândulas venenosas especializadas e injetadas através do aparelho inoculador, podendo gerar alterações locais e sistêmicas na pessoa acidentada. Esses acidentes representam significativo problema de Saúde Pública, especialmente em países tropicais, pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam (PINHO & PEREIRA, 2001).

No Brasil, segundo dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), foram notificados em 2011 137.421 casos de acidentes por animais peçonhentos, sendo 26.124 casos (aproximadamente 20%) por serpentes peçonhentas. O gênero *Bothrops* (representado pela antiga classificação taxonômica das serpentes brasileiras na qual hoje é representado pelas espécies dos gêneros *Bothriopsis*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis*) é responsável por cerca de 85% dos casos (22.257 notificações) (SINAN, 2011), os quais não apresentam alta

letalidade, mas devido à alta incidência, são considerados de grande importância epidemiológica no país (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003).

O quadro clínico observado no envenenamento botrópico caracteriza-se por efeitos sistêmicos e locais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). As manifestações locais são caracterizadas por dor e edema persistentes no local da mordidas, de intensidade variável e, em geral, de instalação precoce e caráter progressivo. Equimose e hemorragias no ponto da mordida são frequentes e bolhas podem aparecer na evolução do quadro clínico, acompanhado ou não de necrose (CARDOSO, 1997). As manifestações sistêmicas são caracterizadas por efeitos cardiovasculares, que levam a uma resposta hipotensiva, além de distúrbios hemostáticos, evidenciado por deficiência na coagulação, alteração na agregação plaquetária e depleção de fibrinogênio. A sequência dos eventos relacionados à coagulopatia culmina em sangramentos de ferimentos cutâneos pré-existentes e hemorragias à distância (AMARAL et al., 1985; CARDOSO, 1997; BORGES et al., 1999; HATI *et al.*, 1999; RUCAVADO et al., 2000; FRANÇA et al., 2003). Alguns desses efeitos são ilustrados na Figura 3.

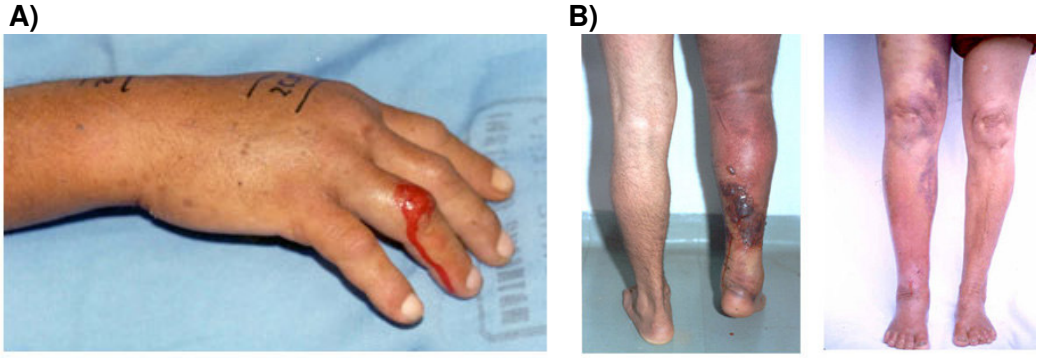



**Figura 3. Acidente botrópico. A)** Alterações locais: Sangramento pelos orifícios de inoculação da presa, associada ao edema (inchaço) e a dor. **B)** A incoagulabilidade sangüínea observada pela presença de bolhas de conteúdo variável (seroso, hemorrágico, necrótico, purulento) e hemorragia observada pela presença de hematomas.

**Fonte:** http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mVI.a.botr.htm

Antes de continuarmos com a descrição dos aspectos fisiopatológicos das coagulopatias causadas pelo envenenamento ofídico e descrever o papel das classes de toxinas que atuam nessa resposta, faremos uma revisão do processo fisiológico da hemostasia como forma de revisão dos complexos eventos relacionados a esse sistema.

### 1.4 Fisiologia da hemostasia

A hemostasia é um processo fisiológico envolvido com a fluidez do sangue e com o controle de sangramento frente a uma lesão vascular, iniciando o processo de reparo tecidual. Além da prevenção de sangramento após uma injúria nos vasos sanguíneos, o sistema hemostático pode também ser ativado parcialmente ou integralmente sob outras circunstâncias tais como traumas, pré eclâmpsia ou infecção bacteriana na corrente sanguínea (COLMAN et al., 1994; LIND et al., 2003). O complexo processo hemostático pode ser dividido em três processos: hemostasia primária, secundária e terciária.

#### 1.4.1 Hemostasia primária: eventos vasculares e formação do tampão plaquetário

A hemostasia primária, que é responsável por estancar o sangramento através da formação do tampão ou trombo plaquetário, é caracterizada inicialmente pela participação de células endoteliais que promovem uma vasoconstricção local, diminuindo o fluxo sanguíneo no sítio de sangramento. Em seguida, devido ao rompimento endotelial, causado por dano de qualquer natureza, ocorre a exposição de proteoglicanas presentes na camada subendotelial, como fibras colágenas e fator de vonWillebrand, promovendo a adesão e ativação das plaquetas. O processo de ativação leva a desgranulação de grânulos citoplasmáticos, liberando serotonina, tromboxano $A_2$ e ADP (adenosina-difosfato) armazenados. Essas substâncias são responsáveis pela propagação da ativação de outras plaquetas no local, induzindo o processo de agregação entre essas, e formando o tampão plaquetário que servirá de superfície adequada ao processo de coagulação, envolvendo fatores da coagualção e formando um coágulo resistente (LIND et al., 2003).

### 1.4.2 Hemostasia secundária: coagulação

A hemostasia secundária, também conhecida como sistema de coagulação, é caracterizada pela ação de proteases plasmáticas (fatores de coagulação) na forma de zimogênios (pró-enzimas) que, quando ativados, dão origem às proteases (enzimas) ativas que iniciam uma cascata de reação levando a conversão da molécula de fibrinogênio plasmático em polímeros de fibrina, formando o coágulo. A rede de fibrina estabiliza o tampão plaquetário, acumulando hemácias e leucócitos, dando origem ao trombo (LIND et al., 2003).

#### 1.4.2.1 Modelo Clássico da Cascata de Coagualção

O modelo clássico da cascata de coagulação foi inicialmente proposto em 1964 (DAVIE, 1964; MACFARLANE, 1964). Nele, a sequência de ativação dos fatores (que são numerados de I à XIII de acordo com a ordem de sua descoberta) foi dividida em duas vias: as vias extrínseca e intrínseca. A primeira via clássica de ativação da cascata de coagulação, denominada via extrínseca, inicia-se pela exposição do fator tecidual (FT - componente não presente na corrente sanguínea, portanto um componente “extrínseco”) mediante uma lesão ou ativação vascular e celular. A via intrínseca, por outro lado, é um mecanismo complementar, na qual todos os componentes estão presentes no espaço intravascular, que se inicia após a ativação do sistema de contato. No entanto, ambas as vias compartilham uma via final comum, durante o evento de ativação (COLMAN et al., 1994; TAPPER & HERWALD, 2000).

**Via extrínseca**

O início da coagulação sanguínea está associado a danos nos vasos sanguíneos ou mediado por uma resposta pró-inflamatória, onde esses eventos são capazes de promover a exposição do FT na superfície das células subendoteliais expostas ou induzir a expressão desse fator por leucócitos, plaquetas e células endoteliais, respectivamente, dando início à via extrínseca. O fator tecidual é uma proteína transmembrana que interage tanto com a forma inativa do fator VII, ativando-o por um processo de autólise, quanto com a forma ativa do fator (fator VIIa), já presente na circulação sanguínea. O complexo FT/fator VIIa desencadeia a coagulação sanguínea convertendo o fator X para sua forma ativa (fator Xa) (Fig. 4). O fator Xa pode permanecer associado ao FT ligado às células ou livre no sangue e

podendo se ligar às superfícies próximas das plaquetas ativadas, que formam o tampão plaquetário previamente já instalado no local da lesão. A ativação das plaquetas promove a exposição dos fosfolipídeos carregados negativamente, que tem alto potencial de ligar fatores de coagulação e reunir os complexos, enzima-cofator, que são essenciais para uma eficiente ativação da coagulação sanguínea. Além disso, a reunião de complexos enzima-cofator na superfície das plaquetas aumenta a concentração local dos componentes envolvidos na coagulação e neutralizam a regulação exercida por mecanismos anti-coagulantes (Figura 3) (COLMAN et al., 1994; DAHLBACH, 2000).

**Via intrínseca**

A via intrínseca é definida como o processo de coagulação iniciado por componentes presentes na circulação sanguínea. O início do processo dessa via tem a participação de fatores do sistema de contato (fator XII, pré-calicreína - PC, fator XI e cininogênio de alto peso molecular – CAPM). A ativação do sistema de contato é iniciada pela interação do fator XII ou da pré-calicreína, na presença de CAPM, a uma superfície negativamente carregada (sendo instalada por determinado tipo de anormalidade nos vasos sanguíneos, expondo moléculas como fosfolipídeos e dermatan sulfatos negativamente carregados) e, por um processo de autólise, são geradas as formas ativas, fator XIIa e/ou calicreína. Essas serinoproteases são capazes de aumentar o potencial coagulante por uma retroalimentação positiva gerando mais a forma ativa do fator XII. Ainda, o fator XIIa é capaz de ativar o fator XI na presença de CAPM e, de maneira cálcio dependente, gerando o fator XIa, sendo este último responsável pela ativação do fator IX, também na presença de íons cálcio, gerando IXa. O fator IXa forma o complexo tenase, que é composto pelo cofatores: fator VIIIa, fosfolipídeo de membrana principalmente na superfície de plaquetas, e íons cálcio; é capaz de ativar a molécula do fator X. A partir desse ponto do processo, compartilha a via comum da coagulação (COLMAN et al., 1994; DAHLBACH, 2000) (Fig. 4).

**Via comum**

A partir da formação do fator Xa, ambas as vias, extrínseca e intrínseca, compartilham uma via comum da coagulação que culmina na formação da rede de fibrina. A protrombina é transformada em trombina pelo complexo protrombinase,

composto pelo fator Xa e seu cofator (fator Va), ligados aos fosfolipídeos da superfície de plaquetas e na presença de cálcio. Os fatores que ativam o fator V são o próprio fator Xa e a trombina. Esta última também amplifica a cascata da coagulação ativando os fatores VIII e IX, da via intrínseca. Após sua ativação, o fator VIIIa forma um complexo com o fator IXa na superfície das plaquetas, que juntamente com fosfolipídeos e íons cálcio, é denominado complexo tenase, que ativa o fator X. A ativação do fator XI pela trombina é outro mecanismo de amplificação desta reação, resultando na geração adicional de fator XIa que ativa o fator X (Fig. 4) (COLMAN et al., 1994; DAHLBACH, 2000).

A formação do coágulo ocorre quando o fibrinogênio, uma glicoproteína dimérica composta por três cadeias (α, β e γ) ligadas por pontes dissulfeto, é convertido pela trombina em fibrina, pela clivagem entre os resíduos $Arg^{16}$-$Gly^{17}$ da cadeia α e $Arg^{14}$-$Gly^{15}$ da cadeia β, liberando assim os fibrinopeptídeos A e B além do monômero de fibrina (LI et al., 1996). A trombina é também responsável pela clivagem do fator XIII, uma transglutaminase na forma de zimogênio que, quando ativada, estabiliza o coágulo por induzir formação de ligações covalentes entre os monômeros de fibrina (FURIE & FURIE, 1992). A Figura 4 ilustra o resumo da atuação dos fatores envolvidos no processo da cascata de coagulação pelas vias descritas.

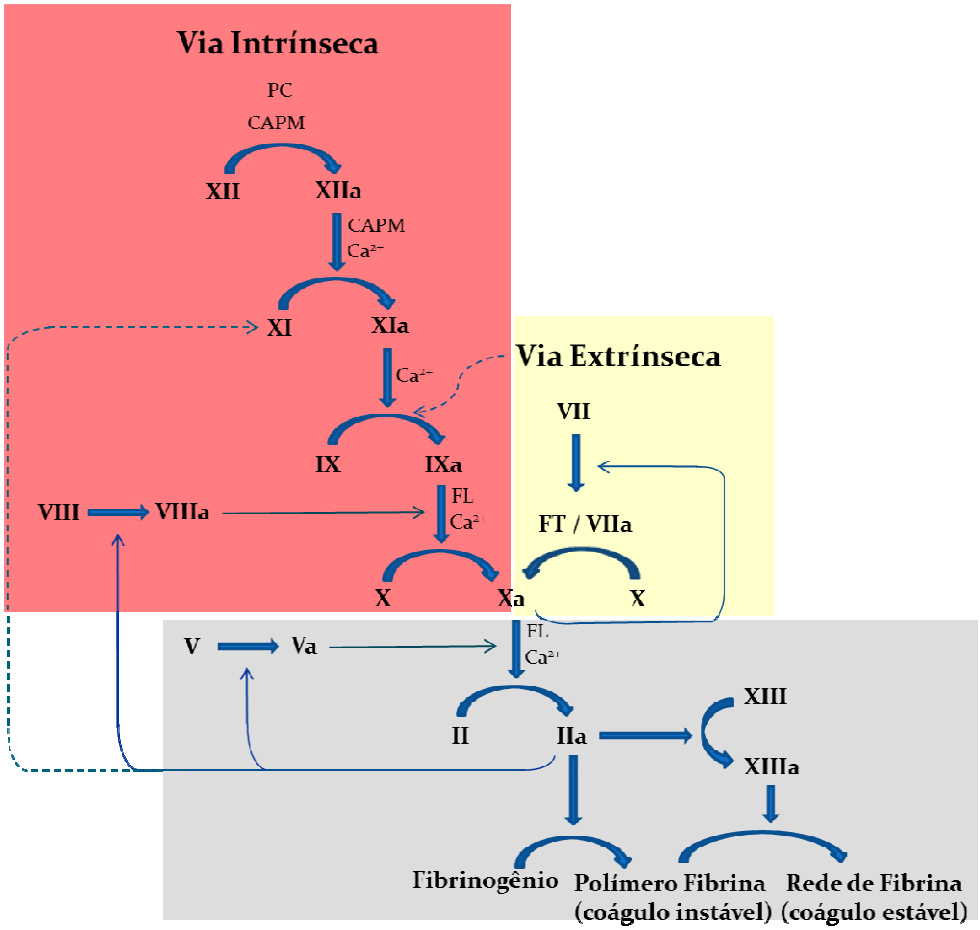



**Figura 4. Modelo clássico da cascata de coagulação: vias intrínseca e extrínseca.** O modelo proposto em 1964 representado pela reação em cascata de ativação de zimogênios gerando serinoproteases. As reações das vias extrínseca, intrínseca e via comum estão destacas pelas cores bege, vermelha e cinza, respectivamente. PC – Pré-calicreína. CAPM – Cinogênio de Alto Peso Molecular. FL – Fosfolipídeo. $Ca^{2+}$ - íon cálcio.

### 1.4.2.2 Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares

Apesar do sistema de coagulação ser dividido tradicionalmente (para fins didáticos e para testes laboratoriais *in vitro*) em duas vias de ativação, as vias extrínseca e intrínseca, essa divisão não ocorre fisiologicamente devido à interdependência entre as duas vias.

Importantes observações levantadas por grupos de pesquisa a respeito do processo de coagulação sanguínea levaram alguns autores a elaborarem uma revisão dos modelos de coagulação até então propostos. Dentre as observações, a partir de dados clínicos e ensaios *in vitro,* podemos citar algumas principais:

- Pacientes deficientes de algum dos fatores do sistema de contato (fator XII, PC ou CAPM) apresentaram prolongado tempo de tromboplastina parcial (ensaios

laboratorial para a avaliação da integridade da via intrínseca), apesar de não apresentarem alterações significativas no sangramento. Dos fatores do sistema de contato da via intrínseca, apenas a deficiência no fator XI gera um quadro de incoaguabilidade sanguínea. Sendo assim, o fato de alguns dos fatores da via intrínseca não serem essenciais para o processo de coagulação, levaram pesquisadores a concluir que a via não apresenta um papel fisiológico verdadeiro na hemostasia (Seligsohn, 2007).

- O complexo fator tissular/fator VIIa atua não apenas ativando o fator X, mas também o fator IX, um componente da via intrínseca (ROBERTS et al., 2006);

- Outro fator importante foi a descoberta de que a trombina é um ativador fisiológico do fator XI, um componente da via intrínseca (ROBERTS et al., 2006).

Portanto, essas e outras observações levaram a conclusão de que o principal evento envolvido no início do processo de hemostasia *in vivo* é a formação do complexo fator tissular/fator VIIa no local da lesão tecidual (HOFFMAN et al., 2001). Assim, as deficiências de fatores VIII e IX, que resultam na hemofilia A e B, respectivamente, são consideradas hoje como deficiências da via fator tissular/fator VIIa, mesmo que as moléculas do fator IX e VIII pertençam a via intrínseca (ROBERTS et al., 2006). Dessa forma, a participação no processo de coagulação dos fatores do sistema de contato é creditada apenas como uma via de auxílio através de retroalimentações positivas, a partir de componentes gerados pela via do fator tissular/fator VIIa (ROBERTS et al., 2006).

Assim, hoje postula-se que o modelo de coagulação fisiológico apresenta o envolvimento celular como suporte para as reações da cascata de coagulação. Esse novo mecanismo preconiza que substâncias pró coagulantes ativadas permaneçam localizadas no sítio da lesão para a formação do trombo no local. Neste modelo, o processo de coagulação sanguínea é iniciado pela exposição do FT na corrente sanguínea. Dessa forma, o processo de hemostasia para este modelo é descrito com três fases sobrepostas: iniciação, amplificação e propagação (Ferreira et al., 2010).

**Fase de Iniciação**

A exposição de células subendoteliais (células do músculo liso e fibroblastos, as quais o FT é expresso constitutivamente), causada por uma lesão vascular, além da ativação de células endoteliais ou monócitos, causado por um processo pro-inflamatório, fazem com que o FT seja exposto na circulação sanguínea e atue como um receptor para o fator VII, levando à formação do complexo TF/fator VIIa localizado na membrana celular e iniciando o processo de coagulação pela ativação de pequenas quantidades dos fatores

X e IX. Como já descrito anteriormente nos eventos do processo da via extrínseca de coagulação, o complexo protrombinase (fator Xa, cofator Va, fosfolipídeo de membrana e íons cálcio) formado na superfície da célula que expressa o FT, transforma pequenas quantidades de protrombina (fator II) em trombina (fator IIa), que são insuficientes para completar o processo de formação do coágulo de fibrina, mas são de fundamental importância para a fase de amplificação da coagulação (Fig. 5) (ROBERTS et al., 2006).

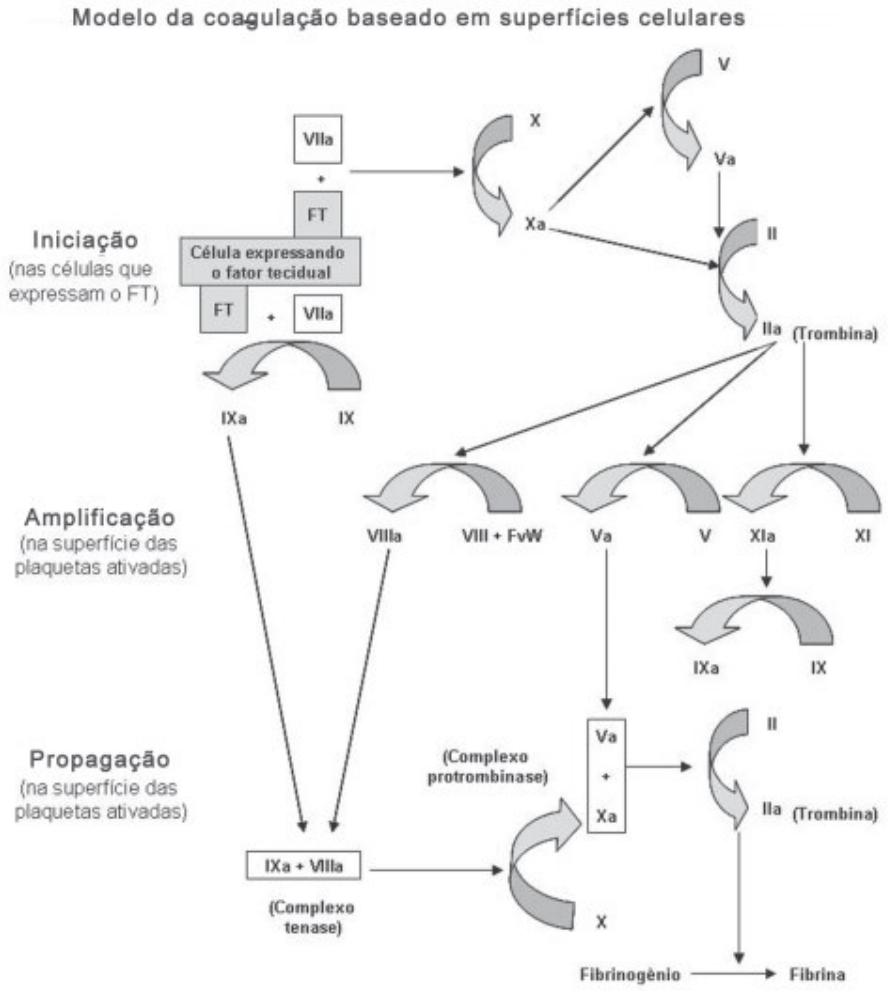



**Figura 5. Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares.** Esquema do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares representado pelas fases de iniciação, amplificação e propagação. **Fonte:** FERREIRA et al. (2010).

### Fase de Amplificação

Após o processo de agregação plaquetária e formação do trombo de plaquetas (como discutido em *hemostasia primária*), a pequena quantidade de trombina gerada na fase de iniciação amplifica o processo da coagulação

proporcionando ativação de mais plaquetas, aumentando a adesão das plaquetas e ativando os fatores V, VIII e XI. Agora com os fatores Va, VIIIa e IXa na superfície das plaquetas, inicia-se o processo hemostático culminando na formação de fibrina estável, que consolida o tampão plaquetário inicial (Fig. 5) (FERREIRA et al., 2010).

**Fase Propagação**

A fase de propagação é caracterizada pela produção de complexos tenases e protombinases que são agrupados na superfície das plaquetas ativadas. O complexo tenase (fator IXa, cofator VIIIa, fosfolipídeo membrana plaqueta e íons cálcio) forma-se quando o fator IXa move-se da célula com FT expresso, onde é ativado, para ligar-se ao receptor expresso nas plaquetas ativadas. O complexo fator VIIIa/IXa ativa o fator X que, juntamente com o fator Va, formam o complexo protrombinase. O complexo protrombinase intensifica a produção de trombina, que converte o fibrinogênio solúvel em fibrina, e também ativa o fator estabilizador da fibrina, fator XIII, para formar o coágulo de fibrina hemostático (Fig. 5) (FERREIRA et al., 2010).

Assim, uma vez formado o coágulo de fibrina estável sobre a área lesada, o processo de coagulação deve se limitar ao sítio da lesão, controlando o excesso de ativação da coagulação por meio de anticoagulantes naturais como o inibidor da via do fator tecidual (que atua inibindo o complexo FT/fator VIIa), a proteína C ativada (PCA – inibe o fator Va pela ação proteolítica e degradação do mesmo), a proteína S ativada (PSA - inibe o fator VIIIa pela ação proteolítica e degradação do mesmo), e a anti-trombina (AT – promove interação covalente com trombina e fator Xa inibindo-os) (FERREIRA et al., 2010).

### 1.4.2.3 Fatores de Coagulação dependentes de vitamina-K

Os fatores de coagulação dependentes de vitamina-K são zimogênios precursores de serino proteases que, ao sofrerem ativação proteolítica, liberam a forma enzimática ativa. Pertencem a esta classe os fatores II (protrombina), VII, IX e X, além da proteína C que atuam como fatores anticoagulantes (MATSUZAKA et al., 1993; LIND et al., 2003). Todas as moléculas dessa classe apresentam uma estrutura similar, composta pelos domínios Gla (na região N-terminal), EGF-like (do inglês *Epidermal Growth Factor* – Fator de Crescimento Epidermal - exceto pela molécula de protrombina que apresenta o domínio Kringle ao invés de EGF-like) e o domínio serino protease na região carboxi terminal (Fig. 6). Essa classe de fatores de coagulação é sintetizada no fígado onde, previamente à sua secreção para o plasma como zimogênios do sistema

de coagulação, passam por modificações pós-traducionais. Dentre essas modificações podem-se citar a glicosilação, geralmente ricas em resíduos de manose, e a γ-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico (Glu) na região N-terminal (domínio Gla), convertendo-os em resíduos de ácido γ-carboxiglutâmico (Gla) pela enzima gamma-glutamil carboxilase que tem a vitamina K como cofator. Essa γ-carboxilação do domínio Gla apresenta uma grande importância funcional para esses fatores, uma vez que esse domínio é responsável por mediar a interação do fator de coagulação a lipídios de membrana (principalmente fosfatidilserina) o que leva a um aumento da atividade catalítica da forma ativa do zimogênio. A partir desses levantamentos, essa classe de fatores de coagulação que necessitam da γ-carboxilação de resíduos de Glu na região N-terminal foram chamados de fatores dependentes de vitamina K (ROBERTS et al., 2006).

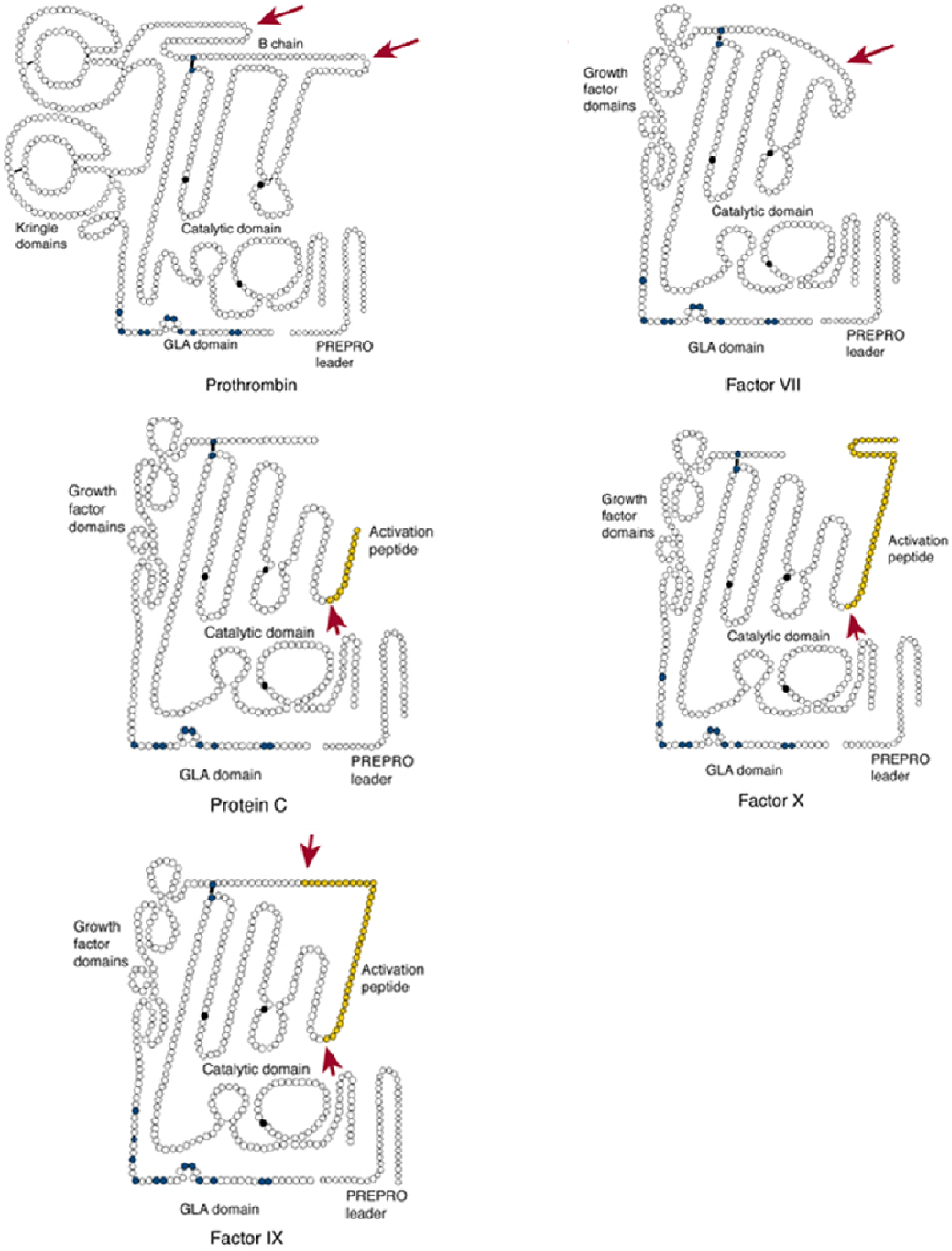



**Figura 6. Fatores de coagulação dependentes de vitamina K.** A figura ilustra os elementos estruturais básicos dos zimogênios pertencentes a essa classe. Os pequenos círculos representam cada aminoácido. O peptídeo sinal está indicado pela separação dessa sequência da cadeia polipeptídica. Os resíduos de ácido γ-carboxiglutâmico presentes no domínio Gla estão representados em azul. A molécula de protrombina difere dos outros fatores pela presença do domínio Kringle, ao invés do domínio EGF-like presente nos outros fatores. O sítio catalítico, composto pelos resíduos His, Asp e Ser, do domínio serino protease de cada fator está indicado pelos círculos pretos. Os sítios de clivagem dos fatores, para geração da forma ativa, a partir do zimogênio estão representados pelas setas. Nos fatores IX, X e proteína C, o peptídeo liberado pela ativação desses fatores está indicado pelos círculos amarelos. **Fonte:** ROBERTS et al., (2006) modificada.

**Protrombina**

Grande parte do processo da cascata da coagulação sanguínea consiste na conversão de zimogênios plasmáticos inativos em serinoproteases ativas. A protrombina é caracterizada como o zimogênio circulante da trombina, uma serinoprotease responsável pela proteólise do fibrinogênio, formando fibrina. Ambas as protrombinas, bovina e humana, são glicoproteínas com massa molecular de aproximadamente 70kDa. Assim como os outros fatores acima citados, também é submetida aos processos de glicosilação e γ-carboxilação de resíduos de Glu durante sua biosíntese. Estruturalmente, a molécula de protrombina possui três domínios. O domínio ácido γ-carboxiglutâmico é formado pelos 47 resíduos N-terminais de aminoácidos, sendo responsável pela interação com íons cálcio dos fosfolipídeos de membrana. Essa função é essencial pela ativação da protrombina. O domínio Kringle é composto pelos 80 resíduos de aminoácidos seguintes ao domínio ácido γ-carboxiglutâmico, contendo seis resíduos conservados de cisteína, que formam três pontes internas dissulfeto (Fig. 7) (ROBERTS et al., 2006).

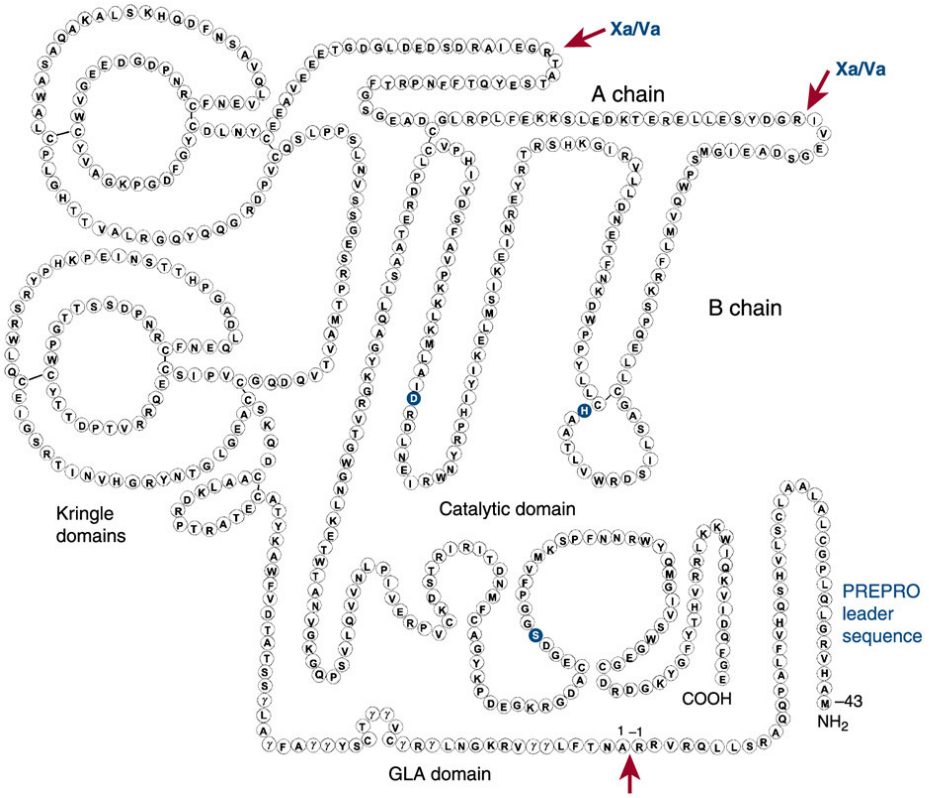



**Figura 7. Representação da estrutura primária da molécula de protrombina.** A figura representa a estrutura primária da protrombina com a sua composição de aminoácidos, além dos domínios da molécula (domínios GLA, Kringle e Catalítico). Os resíduos de GLA estão indicados por Y. O sítio de clivagem para a remoção do peptídeo líder em modificações pós-translacionais está ilustrado pela seta vermelha sozinha. O sítio catalítico da molécula de trombina (representado pelos aminoácidos His, Asp e Ser), localizado na cadeia B (B chain), está ilustrado em azul. Sítios de clivagem do complexo protrombinase (fator Xa/fator Va) estão ilustrados pelas setas em vermelho (Xa/Va).

**Fonte:** ROBERTS et al., 2006.

A região C-terminal da molécula de protrombina é composta por uma região catalítica serinoprotease. O processo enzimático fisiológico de ativação da protrombina consiste da ação do complexo protrombinase (fator Xa, cofator Va, fosfolipídeo de membrana e íons cálcio) sobre o substrato protrombina. Assim, o fator $X_a$ catalisa a ativação da protrombina humana pela clivagem proteolítca entre os resíduos de aminoácido $Arg^{271}$-$Thr^{272}$ e $Arg^{320}$-$Ile^{321}$ (Fig. 8). A cadeia polipeptídica composta pelos resíduos 1 a 271 (chamado de fragmento 1.2), contendo domínios Gla e Kringle que é responsável pela interação com fosfolipídeos de membrana, possui massa molecular de 34.500 Da e é liberada na forma de peptídeo de ativação. Os resíduos 272 a 320 compõem a cadeia A da $\alpha$-trombina, a qual é ligada por pontes dissulfeto à cadeia B da trombina (resíduos 321-581). De maneira que duas clivagens da molécula de protrombina são necessárias para a formação de $\alpha$-trombina e duas vias cinéticas são possíveis na ativação da protrombina (Fig. 8). Uma clivagem única entre os resíduos $Arg^{271}$-$Thr^{273}$ (reação A1 da Fig. 8) formam o fragmento 1.2 e uma espécie intermediária conhecida como pretrombina 2. A pretrombina 2 é composta pelas cadeias A e B da $\alpha$-trombina e possui a ligação $Arg^{320}$-$Ile^{321}$ intacta, tornando-a cataliticamente inativa. A conseguinte proteólise desta ligação $Arg^{320}$-$Ile^{321}$ (reação B2) converte a pretrombina 2 em $\alpha$-trombina. Alternativamente, a clivagem única na molécula de protrombina entre os resíduos $Arg^{320}$-$Ile^{321}$ (reação C1) gera um produto conhecido como meizotrombina, um intermediário cataliticamente ativo. Uma nova proteólise sobre a meizotrombina pelo fator $X_a$ em $Arg^{271}$-$Thr^{273}$ (reação D2) forma os produtos, fragmento 1.2 e $\alpha$-trombina ativa. Uma terceira via de ativação, através de um processo contínuo de proteólise com a formação direta da $\alpha$-trombina ativa é demonstrada na reação E 1,2 (Fig. 8).

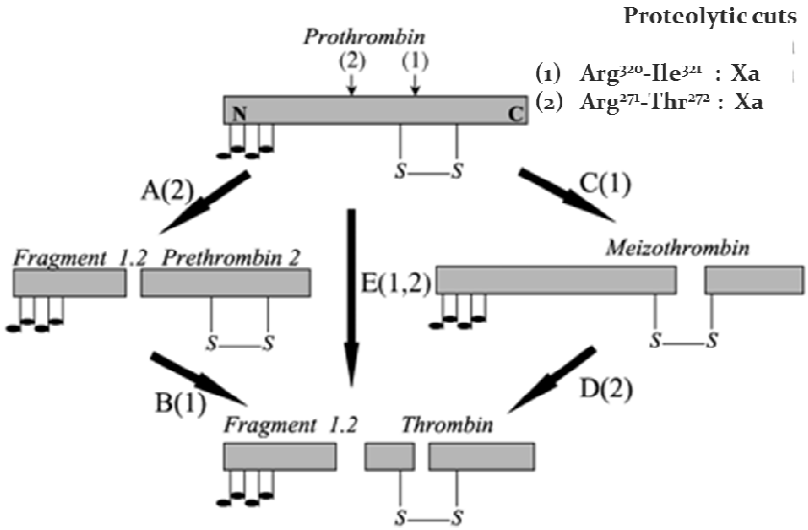



**Figura 8. Representação esquemática da ativação da protrombina humana.** A protrombina consiste de um domínio N-terminal de ligação à membrana (fragmento 1.2) e um domínio catalítico C-terminal (pretrombina 2). Para a ativação da protrombina e formação da α-trombina, duas ligações peptídicas ($Arg^{271}$-$Thr^{271}$ - sítio 2; e $Arg^{320}$-$Ile^{321}$- sítio 1) são cataliticamente hidrolizadas pelo fator $X_a$. Assim, duas vias cinéticas de ativação são possíveis, formando intermediários inativos (reação A2 formando fragmento 1.2 e pretrombina 2) e ativos (meizotrombina). A formação final de trombina ativa e fragmento 1.2 é comum a ambas as vias (reação B1 e D2, respectivamente).

**Fonte:** WEINREB et al., (2003).

### Fator X

O Fator X da cascata de coagulação encontra-se na circulação sanguínea como zimogênio, o qual é composto por duas cadeias ligadas por pontes dissulfeto, e apresenta peso molecular de 59 kDa, sendo a cadeia leve apresentando ~17 kDa e a pesada ~40 kDa. A cadeia leve é composta pelo domínio Gla, com seus 11 resíduos de ácido glutâmico γ-carboxilados, além de dois domínios EGF-like (domínio fator de crescimento). A cadeia pesada apresenta o peptídeo de ativação composto por 52 resíduos de aminoácido na porção N-terminal, além do domínio catalítico (Fig. 9) (ROBERTS et al., 2006).

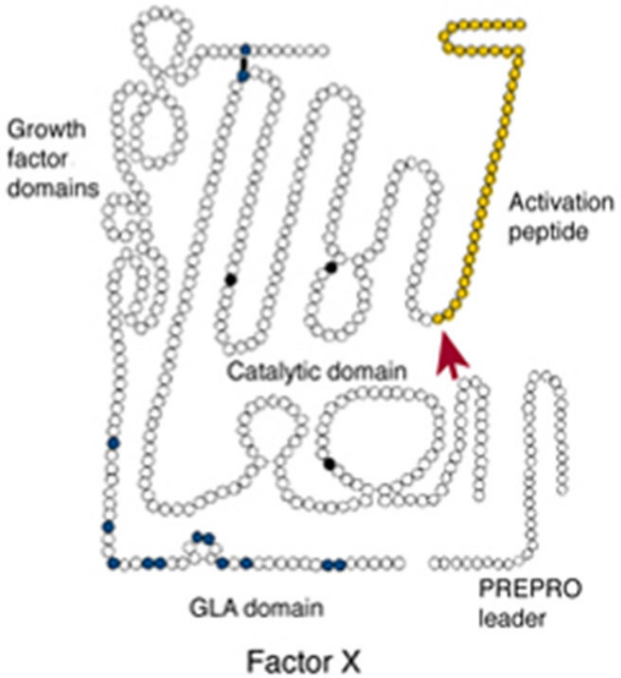



**Figura 9. Representação da estrutura primária da molécula de Fator X.** A figura representa a estrutura primária do Fator X com a sua composição de aminoácidos, além dos domínios da molécula (domínios GLA, fator de crescimento e Catalítico). O sítio de clivagem para a remoção do peptídeo líder em modificações pós-translacionais está ilustrado como PREPRO leader. O sítio de clivagem do complexo fator tecidual/fator VIIa ou complexo fator IXa/fator VIIIa está evidenciado pela seta em vermelho. **Fonte:** ROBERTS et al., 2006.

O Fator X pode ser ativado em Fator Xa tanto pelo complexo Fator VIIa/Fator-tecidual quanto pelo complexo Fator IXa/Fator VIIIa, através da clivagem da ligação entre os resíduos $Arg^{194}$-$Ile^{195}$, na região N-terminal da cadeia pesada do Fator X (Fig. 10). O complexo Fator Xa/fosfolipídeos de membrana/cálcio/Fator Va é chamado de complexo protrombinase e é responsável pela ativação do Fator II (protrombina), gerando trombina. O Fator Xa pode ser inibido por inibidores de proteases plasmáticas, como a serpina Anti-Trombina (AT) e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI do ingês *Tissue fator Pathway Inhibitor*) (ROBERTS et al., 2006).

Como a trombina, o Fator Xa está envolvido em diferentes atividades biológicas não diretamente relacionadas à coagulação. O Fator Xa apresenta atividade mitogênica para células da músculatura lisa (GASIC et al., 1992), além de atividade pró inflamatória mediada por receptores específicos como a família dos receptores PAR (do inglês *Protease Activated Receptors*) (ALTIERI & EDGINGTON, 1990).

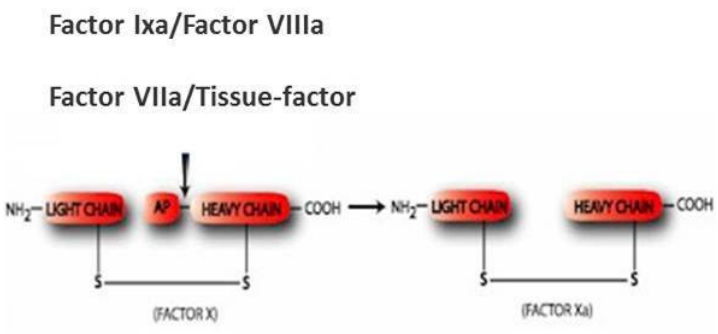



**Figura 10. Representação da ativação do Fator X.** O Fator X da cascata de coagulação pode ser ativado pelos complexos tenase (Fator IXa/Fator VIIIa) ou Fator VIIa/Fator Tecidual pela clivagem proteolítica entre os resíduos $Arg^{194}$-$Ile^{195}$ da cadeia pesada (*heavy chain*), indicado pela seta, gerando o Fator Xa e o peptídeo AP que contém 52 resíduos de aminoácido.

**Fonte:** modificado de http://www.haemtech.com/images2/IXa.jpg

### 1.4.3 Hemostasia Terciária: fibrinólise

A hemostasia terciária é a fase caracterizada pelo processo de fibrinólise, responsável pela dissolução do coágulo de fibrina formado em excesso, sendo fundamental para a volta da fluidez do sangue no local de reparo tecidual (LIND et al., 2003). A plasmina, proteína responsável pela lise da rede de fibrina, é a forma ativa do zimogênio plasminogênio que está ligado internamente à rede de fibrina. O ativador tecidual do plasminogênio (TPA – do inglês *tecidual plasminogen activator*), liberado pelo endotélio da área da lesão, é responsável pela formação da plasmina a partir do plasminogênio, desencadeando o processo de fibrinólise que limita a progressão desnecessária da trombose (ROBERTS et al., 2006).

A plasmina, além de agir na degradação direta da fibrina, também é capaz de clivar o fibrinogênio na forma não polimerizada. Essa ação sobre a forma polimerizada ou não do fibrinogênio leva a formação dos "produtos de degradação da fibrina" (PDF). Os PDFs são removidos da circulação principalmente pelo fígado e pelo sistema retículo endotelial (FERREIRA et al., 2010).

### 1.5 Envolvimento de peçonhas ofídicas no processo de hemostasia

Uma vez revisados os eventos relacionados ao sistema hemostático de coagulação, abordaremos o papel das classes de toxinas que atuam nessa resposta, além dos aspectos fisiopatológicos das coagulopatias causadas pelo envenenamento ofídico.

#### 1.5.1 Toxinas que atuam na hemostasia

Diversos componentes das peçonhas ofídicas são capazes de afetar o sistema hemostático. As toxinas envolvidas nesse processo podem ter ação coagulante, por apresentarem atividade trombina-like, ou por ativar os fatores II (protrombina) ou X da cascata de coagulação (KINI et al., 2001). Outras podem ter ação anticoagulante, pela ativação da proteína C, que inibe alguns fatores de coagulação, ou pela inibição direta da trombina ou de alguns fatores da cascata de coagulação, como os fatores IX e X (KINI, 2006). Além disso, as toxinas podem apresentar atividade fibrino(geno)lítica, que dissolve a rede de fibrina ou impede sua formação pelo consumo do fibrinogênio ocasionando a incoaguabilidade sanguínea freqüente em acidentes ofídicos (SWENSON & MARKLAND, 2005). Existem também toxinas com ação no endotélio vascular, gerando o quadro hemorrágico freqüente nestes acidentes (GUTIERRÉZ & RUCAVADO, 2000); e com ação direta sobre as plaquetas, interferindo na sua agregação (KAMIGUTI, 2005).

##### 1.5.1.1 Toxinas que atuam na função plaquetária

As plaquetas representam um fator vital no processo de hemostasia, atuando como “linha de frente” no desenvolvimento do tampão inicial no local da lesão vascular, impedindo o sangramento. O processo de agregação plaquetária envolve a ativação de receptores de membrana da superfície da plaqueta, além da participação de glicoproteínas e integrinas responsáveis pela interação entre elas. Toxinas isoladas de peçonhas de serpentes que atuam sobre plaquetas podem, basicamente, induzir ou inibir o processo de agregação (WHITE, 2005). Dentre as classes de toxinas já descritas até o momento que interferem nessa atividade temos:

- Lectinas-like podem atuar tanto como inibidoras da agregação por interagir com a glicoproteína Ib (GPIb) impedindo a interação do fator vonWillebrand (vW) à trombina ou ristocetina (agonistas da agregação) (NAVDAEV et al., 2001), ou como agonistas da agregação, por interagirem com vW e GPVI expostos na membrana

basal endotelial ou na superfície de plaquetas, respectivamente, induzindo a resposta palquetária (POLGAR et al., 1997; DU et al., 2002; FUKUDA et al., 2002; LEE et al., 2003).

- Toxinas da classe das desintegrina-like são capazes de interagir com as integrinas GPIIb/IIIa das subfamílias $\beta_1$ e $\beta_3$ da superfície das plaquetas, incluindo os receptores de fibrinogênio $\alpha_{IIb}$ $\beta_3$, vitronectina $\alpha_v\beta_3$ e fibronectina $\alpha_5\beta_1$, inibindo a interação dos agonistas ADP, trombina, colágeno e ácido aracdônico (CLEMETSON et al., 2005).

- Fosfolipases $A_2$ ($PLA_2$) podem atuar induzindo agregação pela ação enzimática de clivagem dos fosfolipídeos de membrana da plaqueta liberando ácido aracdônico, o qual é um conhecido agonista da agregação (KINI & EVANS, 1990; MOUNIER et al., 2001), ou podem apresentar uma função antagonista pela interação das $PLA_2$ com receptores da superfície da plaqueta inibindo o processo de agregação (LANG et al., 1995; HUANG et al., 1997).

- Proteases podem induzir o processo de agregação plaquetária através da ação proteolítica sobre receptores de membrana de plaquetas. Algumas serinoproteases foram descritas como apresentando atividade proteolítica sobre receptores PAR (do inglês *protease activated receptors*) ou interação sobre receptores GPIb. Já algumas metaloproteases são capazes de induzir a agregação pela ação proteolítica sobre receptores GPIb e fator vonWillebrand. Ainda, metaloproteases que apresentam o domínio desintegrina-like podem apresentar uma ação inibitória de agregação pela ação desse domínio (LU et al., 2005).

#### 1.5.1.2 Toxinas que atuam sobre fatores da coagulação sanguínea

Dentre as toxinas que atuam sobre os fatores de coagulação temos:

**Ativadores de fator V**

O fator V é uma glicoproteína multi-funcional de 330 kDa, com um importante papel nos processos pró e anticoagulantes. Fisiologicamente, o zimogênio fator V é ativado por clivagem proteolítica pela trombina originando o fator V ativado (FVa). O FVa atua como cofator do Fator Xa, formando o complexo protrombinase responsável pela ativação da protrombina. Alguns ativadores de FV foram isolados a partir da peçonha de serpentes e pertecem as classes das serino ou

metaloproteases. Essas enzimas catalisam a clivagem proteolítica no resíduo $Arg^{1545}$-$Ser^{1546}$ (ROSING et al., 2001).

**Enzimas Trombina-símiles**

De forma geral, serinoproteases de peçonhas de serpentes atuam no processo hemostático pela ativação específica de componentes da coagulação sanguínea, na fibrinólise e agregação plaquetária. Algumas toxinas dessa classe mimetizam funcionalmente a trombina fisiológica, atuando na clivagem enzimática do fibrinogênio formando fibrino peptídeos A e B, além dos monômeros de fibrina, levando a formação do polímero de fibrina. Essas enzimas são do tipo thrombina-símiles (trombina-like) (KINI et al., 2001).

**Inibidores do fator IX/X**

Diversas toxinas da classe lectinas-like do tipo-C isoladas da peçonha de serpentes apresentam atividade anti-coagulante através da interação com fatores IX e/ou X da coagulação (MORITA, 2004a). São proteínas compostas por heterodímeros de alta homologia e possuem a capacidade de interagir sobre o domínio Gla dos fatores IX e/ou X, impedindo a capacidade desse último de se ligar, de maneira $Ca^{2+}$ dependente, à fosfolipídeos de membrana e proporcionando o efeito anticoagulante por inibir seu processo de ativação (MIZUNO et al., 1999 e 2001).

**Ativadores da proteína C**

Proteína C é um zimogênio que quando ativado pela trombina, gera a Proteína C ativada a qual catalisa a degradação dos fatores Va e VIIIa, apresentando, assim, propriedades anticoagulantes. A maior parte dos ativadores de proteína C estudados na atualidade foram isolados da peçonha de serpentes do gênero *Agkistrodon*, mas também dos gêneros *Bothrops*, *Trimeresurus* e *Cerastes*. Possuem alta similaridade estrutural com outras serinoproteases e diferem funcionalmente da proteína C ativada fisiológica, pois não requerem trombomodulina como cofator (GEMPELER-MESSINA et al., 2001).

**Ativadores de protrombina**

No processo de coagulação, a formação da trombina ocorre através da ação proteolítica do complexo protrombinase (fator Xa, cofator Va, íon cálcio e fosfolipídeos negativamente carregados da superfície celular) sobre a protrombina (KINI, 2005). Ativadores de protrombina exógenos, como as proteases presentes nas peçonhas de serpentes, exibem certa similaridade e diferenças em relação ao processo de ativação fisiológica da protrombina pelo complexo protrombinase. Assim, baseando-se nas características funcionais, propriedades estruturais e requerimento de cofatores para exercer a atividade, ativadores de protrombina exógenos são classificados em quatro grupos: o grupo A consiste de metaloproteases com capacidade de ativação sem a presença de cofatores. Essas enzimas clivam a protrombina humana entre os resíduos $Arg^{320}$-$Ile^{321}$, liberando meizotrombina que se converte em α-trombina por autólise; o grupo B consiste de metaloproteases cálcio-dependentes, onde a ausência do íon promove a inativação da função proteolítica da protease; ativadores do grupo C pertencem à classe das serinoproteases que requerem cálcio e fosfolipídeos carregados negativamente para exercer sua função; já o grupo D é representado pelas serinoproteases que necessitam dos cofatores cálcio, fator Va e fosfolipídeos para clivarem a protrombina, similarmente ao complexo protrombinase (ROSING & TANS, 1992; YAMADA et al., 1996; KINI et al., 2001).

**Ativadores de fator X**

Ativadores de fator X foram sido isolados das peçonhas das famílias Viperidae e Crotalidae, assim como de algumas espécies da família Elapidae. Esses ativadores pertencem à classe das serino ou metaloproteases (TANS & ROSING, 2001). O ativador de fator X mais estudado é representado pelo RVV-X isolado da peçonha de *V. russelli*, o qual apresenta três cadeias ligadas por pontes dissulfeto: uma cadeia com 58kDa (cadeia pesada) e duas cadeias leves de 19,4 e 16,4 kDa. A cadeia pesada do RVV-X é composta por um domínio de metaloprotease, desintegrina-like e rico em cisteína. As cadeias leves são representadas por lectina-like do tipo-C. É proposto que a RVV-X interage com Gla (domínio vitamina K-dependente do γ-carboxiglutamato) do fator X via as duas cadeias leves do RVV-X, onde a cadeia pesada cliva a ligação entre $Arg^{194}$-$Ile^{195}$ da cadeia pesada do fator X. Metaloproteases ativadoras de fator X de outras peçonhas com estruturas similares

ao RVV-X, provavelmente apresentam mecanismo catalítico similar (TANS & ROSING, 2001).

### 1.5.2 Coagulopatias causadas por acidentes ofídicos

A intervenção de peçonhas de serpentes no sistema hemostático humano, de forma mais ou menos intensas, é um assunto comum entre os aspectos do envenenamento de todas as famílias de serpentes peçonhentas espalhadas pelo mundo, sendo que a diversidade de componentes biologicamente ativos presentes nas peçonhas é refletida na importância dos efeitos clínicos das coagulopatias nos acidentes ofídicos (STOCKER et al., 1994; WHITE, 2005).

A variedade dos efeitos clínicos desencadeados por esses diversos elementos encontrados na peçonha podem, essencialmente, ser resumidos em: (1) coagulabilidade sanguínea reduzida, resultando em um aumento na tendência de sangramento; (2) sangramento contínuo devido a danos em vasos sanguíneos; (3) efeitos secundários devido ao aumento do sangramento, variando desde choque hipovolêmico a danos secundários a órgãos, como hemorragias intracerebrais ou deficiências renais; (4) trombose patológica direta e suas seqüelas, como embolismo pulmonar (WHITE, 2005).

A coagulopatia mais frequente associada ao envenenamento por serpentes no mundo é a chamada VICC (do inglês *Venom-Induced Consumption Coagulopathy*), que resulta da ativação da cascata de coagulação e/ou pela ação sobre a função plaquetária por toxinas presentes na peçonha de serpentes (como as enzimas thrombin-like, ativadores de fator X, ativadores de protrombina, dentre outras), resultando no consumo final dos fatores de coagulação plasmáticos (especialmente o fibrinogênio) e plaquetas, que leva a um processo de coagulação intravascular disseminada (CIVD) e ocorrendo um quadro de incoagulabilidade sanguínea. Ainda, a CIVD pode induzir a formação de microtrombos e a deposição desses na rede capilar, o que poderia contribuir para desencadear danos renais e induzir um processo de insuficiência renal aguda (BARRAVIEIRA & PEREIRA, 1994; LINCK et al., 2010; BUCKLEY et al., 2013).

Os parâmetros clínicos e laboratoriais observados em pacientes acometidos por serpentes peçonhentas são empregados como forma de acompanhamento da evolução do acidente, assim como da regreção do processo patológico após terapia

antiofídica. Dentre as avaliações dos aspectos relacionados aos distúrbios de coagulação, podemos citar:

**Contagem e função de plaquetas**

Dentre os efeitos observados, a trombocitopenia (contagem reduzida no numero total de plaquetas na circulação), é um dos aspectos mais observados nos pacientes acidentados, onde a função plaquetária, daquelas remanescentes, encontra-se comprometida (BARRAVIEIRA & PEREIRA, 1994).

**Tempo de coagulação**

O tempo de coagulação, avaliado pelo testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) (testes para avaliação dos parâmetros funcionais da via intrínseca e extrínseca de coagulação, respectivamente), além da dosagem de fibrinogênio, apresentam valores prolongados (TP e TTPa) e concentração de fibrinogênio reduzidos devido ao consumos dos fatores sanguíneos (BARRAVIEIRA & PEREIRA, 1994).

**Outros parâmetros**

Além dos parâmetros acima citados, que são muito úteis devido a fácil e rápida execução e obtenção dos resultados, outros parâmetros de coagulação também são analisados. A quantificação da formação dos dímeros-D, que são fragmentos da degradação da fibrina, está relacionada ao processo de fibrinólise fisiológico devido ao processo e formação de microtrombos e depósitos de fibrina. Ainda, também é realizada a detecção do complexo Trombina/Antitrombina III, uma vez que a formação desse complexo ocorre devido à ação de inibidores plasmáticos dos fatores de coagulação ativados gerados. Essas avaliações citadas são importantes pois, a partir dessas, é possível caracterizar se um processo de CIVD foi instalado e, assim, avaliar a gravidade do envenenamento e planejar procedimentos terapêuticos adequados a serem executados (MARUYAMA et al., 1990; KAMIGUTTI et al., 1992).

## 1.6 Aspectos gerais e toxinológicos da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*

A serpente *Bothrops moojeni*, popularmente conhecida como Caiçaca ou Jararacão, é a principal serpente do gênero que habita as áreas de mata ciliar das

regiões central, norte e sudeste do Brasil (NOGUEIRA et al., 2003). A serpente apresenta um hábito terrícola e uma atividade noturna, alimentando-se basicamente de roedores e lagartos. Apesar da distância do bote das serpentes do gênero *Bothrops* corresponder a aproximadamente 1/3 do seu comprimento e ser dado mais no sentido horizontal, a Caiçaca desfere seu bote mais para o sentido vertical, podendo atingir dessa forma partes mais altas do corpo de uma pessoa. Associado ainda à sua capacidade de adaptar-se com facilidade a ambientes modificados, por apresentar um grande porte (apresentam tamanho de cêrca de 1,5 metros em fase adulta) e apresentar um comportamento agressivo, a espécie *B. moojeni* passou a apresentar uma importância médica e epidemiológica no que se refere aos acidentes ofídicos (MELGAREJO, 2003; 2009).

Em um estudo epidemiológico dos acidentes ofídicos na região noroeste do estado de São Paulo, Rojas e colaboradores (2007) evidenciaram que as serpentes do gênero *Bothrops* foram responsáveis por 65,7% dos casos notificados. Ainda, segundo o estudo, dentre as espécies que habitam essa região, a *Bothrops moojeni* é a que apresenta maior distribuição nas áreas dos acidentes (19,2%), reforçando a hipótese de que a espécie seria a principal responsável pelos acidentes na região, em razão da sua maior abundância na área, se comparada às outras espécies do gênero (KOUYOUMDJIAN & POLIZELLI, 1989; ROJAS *et al*., 2007).

Relatos clínicos dos acidentes causados pelas serpentes da espécie *B. moojeni* indicam o desenvolvimento rápido de uma reação inflamatória expressiva no local da mordida, caracterizada por eritema, dor moderada à intensa, edema, além de alterações hemostáticas como o aumento do tempo de coagulação (KOUYOUMDJIAN & KOUYOUMDJIAN, 1986; KOUYOUMDJIAN & POLIZELLI, 1989). Nos casos considerados moderados e graves, há relatos de complicações decorrentes do efeito local da peçonha de *B. moojeni*, como, por exemplo, a necrose tecidual. Apesar dos dados clínicos a respeito do envenenamento humano por essa espécie de serpente serem limitados, estudos mais detalhados sobre a fisiopatologia dos efeitos nocivos induzidos pela peçonha bruta de *B. moojeni* foram descritos em modelos experimentais animais, dos quais a peçonha participa de eventos biológicos como efeitos miotóxicos, hemorrágicos, hipernocicepcivos, neurotóxicos, inflamatórios e hemostáticos (ZAMUNER *et al*., 2004; MAIORANO *et al*., 2005; Demler et al., 2010; Nadur-Andrade et al., 2013; de Souza et al., 2013).

Diversas toxinas isoladas da peçonha bruta de *B. moojeni* apresentaram capacidade de modular eventos hosmostáticos por induzirem ou inibirem o processo de coagulação plasmática e agregação plaquetária. Dentre as classes podemos citar as miotoxinas, $PLA_2$ e proteases (SERRANO et al., 1993a; SERRANO et al., 1993b; OLIVEIRA et al., 1999; BERNARDES et al., 2008; SANTOS-FILHO et al., 2008; PERCHUC et al., 2010; SALVADOR et al., 2011; de MORAIS et al., 2012; SILVEIRA et al., 2013). Das proteases isoladas, as serinoproteases apresentam uma atividade pró coagulante por serem capazes de induzir a clivagem do fibrinogênio, gerando monômeros de fibrina e consequentemente formação da rede de fibrina, caracterizando-as como serinoproteases do tipo trombina-like (SERRANO et al., 1993a; de OLIVEIRA et al., 2013; VU et al., 2006).

Já as metaloproteases isoladas até o momento, Bmoo FIBMP-I (TORRES et al., 2012), Bmoo MPα-I (BERNARDES et al., 2008), BthMP (GOMES et al., 2009), Moojenin (de MORAIS et al., 2012), e MPB (SERRANO et al., 1993b), apresentam atividade fibrinogenolítica porém, apenas Moojenin e MPB apresentam atividade coagulante, possivelmente pela clivagem específica do fribrinogênio, enquanto as demais possivelmente atuam clivando em posições inespecíficas da molécula. Apesar da distinção entre o mecanismo de clivagem do fibrinogênio, tanto as metaloproteases pró coagulantes quanto as que não induzem coagulação são capazes de induzir a defibrinogenação em animais experimentais, caracterizado pelo consumo do fibrinogênio *in vivo* (GOMES et al., 2009; BERNARDES et al., 2008; de MORAIS et al., 2012; TORRES et al., 2012). No entanto, não existem dados na literatura científica da purificação e isolamento de nenhuma protease, presente na peçonha de *Bothrops moojeni*, com atividade sobre outros fatores da coagulação como o fator X e a protrombina (fator II).

Porém, foram descritos dados sobre a atividade de ativação dos fatores X e protrombina para a peçonha bruta de *Bothrops moojeni*. Perchuc e colaboradores (2005), demonstraram que uma fração de alto peso molecular (contendo proteínas de cerca de 40 à 100 kDa) obtida do fracionamento da peçonha bruta de *B. moojeni* submetida a cromatografia em coluna de fase reversa C-18, apresentou uma expressiva atividade de ativação da protrombina e gerando trombina como produto. Ainda, estudos realizados por Suntravat e colaboradores (2010) mostraram que, das 28 peçonhas brutas analisadas, a peçonha de *B. moojeni* foi capaz de induzir a ativação do fator X da coagulação, gerando fator X ativado como produto. Esses

dados indicam a presença de toxinas capazes de induzir a ativação de fatores da cascata de coagulação.

Levando em consideração os dados epidemiológicos, clínicos e científicos relacionados ao papel da peçonha de *Bothrops moojeni* em distúrbios de coagulação, estudos com o objetivo de avaliar o envolvimento de toxinas, presentes na peçonha, no processo hemostático tornam-se de grande relevância para o melhor entendimento da fisiopatologia da desordem hemostática observada nos envenenamentos. Ainda, os dados gerados a partir dessas análises podem auxiliar no planejamento terapêutico referente ao tratamento de coagulopatias induzidas pela peçonha. Além disso, o isolamento de novos compostos pode colaborar no desenvolvimento de novos agentes que podem ser utilizados tanto no diagnóstico quanto no tratamento de distúrbios hemostáticos.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho consiste no isolamento e na caracterização bioquímica e funcional *in vitro* e *in vivo* de uma nova metaloprotease, a partir da peçonha bruta da serpente *Bothrops moojeni*, além de avaliar sua ação sbre os fatores da cascata de coagulação e seu envolvimento nos diferentes processos hemostáticos, como agregação plaquetária, fibrinólise e estimulação de leucócitos que conduzem a um processo pró coagulante.

## 2.2 Objetivos específicos

- Purificação de uma metaloprotease da classse PIIId por meio da associação de métodos cromatográficos:

• Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-200;

• Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl Sepharose 6 Fast Flow;

• Cromatografia troca aniônica em coluna ES 502 N.

- Avaliar a capacidade de ativação da protrombina e atividade sobre caseína das frações cromatográficas, como forma de rastreamento da fração de interesse, por meio dos seguintes ensaios:

• Ensaio proteolítico sobre caseína;

• Ensaio amidolítico (sobre substrato cromogênico) de ativação de protrombina.

- Confirmar o grau de homogeneidade da protease isolada (moojenactivase) por cromatografia de fase-reversa e troca-aniônica, além da determinação da massa molecular (SDS-PAGE), ponto isoelétrico e presença de glicosilação.

- Determinação da sequencia de aminoácidos da moojenactivase por espectrometria de massa e análise *in silico* pelo alinhamento múltiplo dos peptídeos e outras metaloproteases depositadas em banco de dados.

- Avaliar a atividade de ativação de protrombina pela moojenactivase em após incubação previa em diferentes condições de pH, temperatura, presença de íons divalentes e inibidores.

- Avaliar atividade proteolítica da moojenactivase sobre fatores que participam da cascata de coagulação (Fator X, Protrombina, Proteína C, Plasminogênio) por meio dos seguintes ensaios:

• Ensaio amidolítico de ativação dos fatores citados;

• Do(s) fatore(s) de coagulação que apresentaram atividade amidolítica positiva, foi realizado ensaio proteolítico de ativação do determinado fator e os fragmentos gerados analisados por SDS-PAGE e sequenciamento N-terminal.

• Do(s) fatore(s) de coagulação que apresentaram atividade amidolítica positiva, foi determinada a atividade específica pela atividade amidolítica.

- Avaliar a dose coagulante mínima da protease sobre plasma humano normal e plasma humano deficiente de Fator X.

- Avaliar a atividade fibrinogenolítica pelos ensaios:

• Ensaio proteolítico e análise dos fragmentos gerados por SDS-PAGE;
• Ensaio de coagulação sobre solução de fibrinogênio isolado.

- Avaliar o potencial de modulação da protease na agregação plaquetária.

- Avaliar a atividade fibrinolítica direta da moojenactivase pelo ensaio de fibrinólise direta.

- Avaliar a capacidade da moojenactivase de estimulação de leucócitos mononucleares de sangue periférico (PBMC) pela expressão da citocina proinflamatória TNF-α e a capacidade de expressão do Fator Tecidual e sua atividade pró coagulante.

- Avaliar o potencial hemorrágico local da protease em camundongos.

- Avaliar as alterações de parâmetros hematológicos (contagem células da série vermelha, série branca e plaquetas) e índices hematimétricos (Hematócrito, Volume Corpuscular Médio, Hemoglobina Corpuscular Média, Concentração Hemoglobina Corpuscular Média), em ratos Wistar administrados com moojenactivase.

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 Materiais

### 3.1.1 Peçonha de *Botrops moojeni*

Peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi adquirida das empresas do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda, (Batatais, SP - Registro junto ao IBAMA nº 471301) e do Centro de Extração de Toxinas Animais – CETA (Morungaba, SP - cadastrado Ministério do Meio Ambiente nº 3002678).

### 3.1.2 Amostras de sangue humano periférico

Amostras de sangue humano foram coletadas de doadores, de ambos os gêneros e idades variando de 24 a 48 anos, que não estavam fazendo uso de nenhuma medicação que possa interferir no processo de coagulação (como anti-coagulantes). O sangue periférico foi coletado (cerca de 10 mL por doador) em tubos Vacutainer contendo citrato de sódio a 105 mM ou Heparina sódica 143 U USP (*United States Pharmacopeia*) como anticoagulante (BD Biosciences). Esse procedimento encontra-se de acordo com as exigências do CEP (Comissão de Ética em Pesquisa em Humanos) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (protocolo CEP/FCFRP 196).

### 3.1.3 Animais

Para os experimentos de avaliação do potencial hemorrágico local foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C machos pesando aproximadamente 20 – 25 g. Já para os experimentos de avaliação dos distúrbios de coagulação, foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas pesando aproximadamente 250 g. Todos os animais foram obtidos pelo Biotério Central do Campus USP Ribeirão Preto e mantidos sob condições controladas de temperatura (~24ºC) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água no Biotério de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêutiocas de Ribeirão Preto. Nos dias de experimentação, os ratos foram pesados (para adequação das doses a serem administradas) e levados à sala de experimentação por aproximadamente 3 horas antes do início dos tratamentos. Os procedimentos experimentais foram aprovados

pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, protocolo nº 10.1.993.53.2.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Purificação de uma metaloprotease ativadora de protrombina a partir da peçonha de *Bothrops moojeni*

#### 3.2.1.1 Cromatografia de exclusão molecular

Cerca de 100 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foram suspensas em 1,5 mL de tampão bicarbonato de amônio (Ambic – do inglês *Ammonium bicarbonate* $NH_4(HCO_3)$) 200 mM pH 8,0 e centrifugadas a 11.620 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi então aplicado à coluna (1,8 cm diâmetro x 104 cm altura) contendo resina Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare), previamente equilibrada com o mesmo tampão. Todo o procedimento cromatográfico foi realizado em câmara fria a temperatura de 8ºC. A eluição do material aplicado foi realizada em gradiente isocrático com o mesmo tampão de equilíbrio em um fluxo de 0,3 mL/minuto utilizando bomba peristáltica Pump P-1 (GE Healthcare). O material eluído foi coletado em coletor automático Super-Frac (GE Healthcare) com frações de 3 mL/tubo. As absorbâncias das frações coletadas foram determinadas em comprimento de onda de 280 nm, em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Coulter). As frações foram reunidas por picos de intensidade de absorção, separadas em *pools* (SP-I à SP-VII), liofilizadas e avaliadas quanto à quantificação proteica (ítem 3.2.2.1.), composição proteica por SDS-PAGE (item 3.2.4.1.), atividade protrolítica sobre a caseína (item 3.2.5.1.) e atividade amidolítica de ativação de protrombina (ítem 3.2.5.2.1.).

#### 3.2.1.2 Cromatografia por interação hidrofóbica

A fração SP-I obtida a partir de dois procedimentos de separação por cromatografia de exclusão molecular (item 4.3.1.1.), foi submetidas à cromatografia de interação hidrofóbica. Brevemente, o procedimento cromatográfico foi realizado em sistema AKTA FPLC (GE Healthcare) utilizando-se coluna C 16/10 (1,6 cm x 7 cm) (GE Healthcare) empacotada com resina Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub (GE Healthcare). A eluição do material foi feita com tampão TRIS-HCl a 10 mM em pH

7,6 em um gradiente decrescente e descontínuo de concentrações de NaCl variando de 4 M (inicial) até ausência do sal (tampão Tris-HCl) e água, que foi utilizada como último eluente. Todo o procedimento de eluição foi realizado em um fluxo de 1,8 mL/minuto. O material eluído foi coletado em coletor automático Frac-920 (GE Healthcare) com frações de 10 mL/tubo. O material eluído foi moniotorados pela medida da absorbância a 280 nm. O volume de eluição de cada tampão contendo diferentes concentrações de NaCl, foi monitorado, sendo a troca de tampão realizada quando a intensidade de absorbância estava estabilizada. As frações, reunidas em *pools* por picos de intensidade de absorção, foram dialisadas em membrana de celulose (Sigma-Aldrich) contra tampão Ambic 10 mM pH 8,0. Em seguida os *pools* foram liofilizados e avaliados quanto à quantificação proteica (ítem 3.2.2.1.), composição proteica por SDS-PAGE (item 3.2.4.1.), atividade protrolítica sobre a caseína (item 3.2.5.1.) e atividade amidolítica de ativação de protrombina (ítem 3.2.5.2.1.).

**3.2.1.3 Cromatografia de troca aniônica**

A fração PP-2,5M, obtida no passo cromatográfico por interação hidrofóbica (ítem 3.2.1.2.), foi submetida a cromatografia de troca aniônica em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE - Shimadzu) em coluna ES 502 N (4,15 mL de volume de coluna - Shimadzu) previamente equilibrada em tampão Ambic 10 mM pH 8,0 (eluente A) e eluidas com gradiente segmentado de tampão Ambic 0,5 M pH 8,0 (eluente B). A amostra foi solubilizada em 500 µL do tampão de equilíbrio e centrifugada a 11.620 x*g* por 10 minutos em centrífuga Eppendorf modelo 5804R (Eppendorf). O sobrenadante foi aplicado e submetido ao seguinte gradiente: 1º gradiente, 10 minutos em tampão Ambic 10mM pH 8,0 (eluente A); 2º gradiente, de 10 à 90 minutos, 0-45% eluente B; 3º gradiente, de 90 à 120 minutos, 45 – 45% eluente B; 4º gadiente, de 120 à 150 minutos, 45 - 100% eluente B e permanecendo em 100% de eluente B de 150 a 170 e voltando ao tampão inicial. Este procedimento teve duração total de 190 minutos com fluxo de 0,4 mL/minuto, sendo o procedimento monitorado pela medida de absorbância a 280 nm. O material eluído foi coletado em frações de 0,5 mL/tubo. As frações foram reunidas em *pools* por picos de intensidade de absorção e liofilizadas. Os *pools* obtidos foram avaliados quanto à quantificação proteica (ítem 3.2.2.1.), composição proteica por SDS-PAGE (item 3.2.4.1.), atividade protrolítica sobre a caseína (item 3.2.5.1.) e atividade

amidolítica de ativação de protrombina (ítem 3.2.5.2.1.). A fração EP-VI corresponde a protease isolada e foi submetida aos subsequentes ensaios de caracterização funcional e molecular.

### 3.2.2 Determinação da concentração proteica

#### 3.2.2.1 Método da medida da absorbância a 205/280 nm

A quantificação de proteínas para as amostras obtidas do fracionamento da peçonha bruta e da protease isolada foi realizada pelo método da medida de absorbância 205/280 nm inicialmente desenvolvido por SCOPES (1974), o qual foi descrito e aprimorado por PETERSON (1983). As absorbâncias das amostras a serem quantificadas foram determinadas em pela leitura nos comprimento de onda de 280 e 205 nm, em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Coulter), e a concentração de proteína calculada pela equação:

$$P\,(\text{mg/mL}) = \frac{\mathbf{A}_{205nm}}{[27{,}0 + 120\,(\mathbf{A}_{280nm} \,/\, \mathbf{A}_{205nm})}$$

onde $P$ representa a concentração em mg/mL, $\mathbf{A}_{205nm}$ corresponde ao valor da absorbância da solução em leitura a 205 nm e $\mathbf{A}_{280nm}$ corresponde ao valor da absorbância da solução em leitura a 280 nm.

#### 3.2.2.2 Método do BCA

O método do ácido bicinchoninico (BCA – do inglês *bicinchoninic acid*) se baseia na reação de redução do $Cu^{2+}$ com proteínas, em meio alcalino, produzindo $Cu^{1+}$ e formando um complexo com o BCA, o qual absorve no comprimento de onda de 562 nm. Para a técnica, foi utilizado o kit BCA Protein Assay (Pierce) e o procedimento realizado como descrito pelo fabricante. Uma curva padrão com concentrações de albulmina de soro bovino (BSA) variando de 2.000 à 25 µg/mL foi determinada para o cálculo dos valores de concentração das amostras testadas. Esse método foi utilizado dosagem de proteína do material obtido pelo lisado de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) tratados com moojenactivase.

### 3.2.3 Avaliação do grau de homogeneidade da moojenactivase por cromatografia em coluna C-18

O grau de homogeneidade da protease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, foi avaliada por meio de CLAE em coluna de fase reversa CLC-ODP C-18 (4,6 x 150mm - Shodex). A coluna foi previamente equilibrada com a fase móvel A (TFA 0,1%), onde foram aplicados 500 µL de solução moojenactivase (150 µg/mL em TFA 0,1%). A eluição do material foi realizada por um gradiente linear crescente com fase móvel B (acetonitrila 80%) sendo aplicado até 100% da fase móvel B em 70 minutos. O procedimento foi realizado com um fluxo de 1 mL/minuto e monitorado pelo detector SPD-10AV à 280nm.

### 3.2.4 Caracterização Bioquímica

#### 3.2.4.1 SDS-PAGE

O conteúdo proteico de diferentes procedimentos experimentais foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE – do inglês S*odium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), segundo a técnica descrita por LAEMMLLI (1970). O gel preparado contém acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 30:8 (m/m), Tris-HCl 125 mM e SDS 0,1 %, cuja polimerização foi iniciada pela reação entre persulfato de amônia (0,5 % m/m) e tetrametiletilenodiamina (Temed – 16 mM). O gel preparado é composto por duas fases com concentrações de polimerização diferentes: um gel superior de empacotamento à 5%; e um gel inferior de separação à 12%. As amostras aplicadas ao gel foram solubilizadas em tampão de amostra contendo Tris- HCl a 125 mM, NaCl a 200 mM, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,004% e glicerol a 10%. As amostras foram tratadas ou não com agente redutor β-mercaptoetanol (5% em tampão de amostra) e levadas a incubação à 100°C por 10 minutos e logo em seguida aplicadas ao gel. O tampão de eletrodo é composto por glicina a 200 mM, Tris-HCl a 25 mM e SDS a 3 mM. A corrida eletroforética foi realizada com uma fonte Electroforesis Power Supply EPS 601 (GE Healthcare) com uma corrente de 20 mA à 150 V, onde o tempo de corrida foi de cerca de 2 horas ou até que as amostras atingissem 1,0 cm do final do gel. A coloração dos géis para proteína foi feita com Coomassie Brilliant Blue G 250 a 0,02% (Sigma-Aldrich) em $H_2O$/metanol 1:1 (v/v) por 60 minutos e descorados com trocas sucessivas com

solução de ácido acético glacial a 7% (v/v). Como padrão de peso molecular, foi utilizado *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo Scientific) composto por beta galactosidase (116 kDa), albumina soro bovino (66,2 kDa), ovoalbumina (45KDa), lactato desidrogenase (35 kDa), RNase Bsp98I (25 kDa) e beta lactoalbumina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

**3.2.4.2 Focalização Isoelétrica**

O ponto isoelétrico (pI) foi determinado segundo o método descrito por VESTERBEG (1972) e com pequenas modificações de acordo com Arantes e colaboradores (1989). Em uma placa fina de vidro de 18 x 11 cm, foi aplicada solução *Bind silane* (GEhealthcare) e montada entre duas placas grossas do mesmo tamanho, previamente tratadas com solução *Repel silane* (GEhealthcare), e fixadas por meio de pinças metálicas e contendo espaçador de 0,2 cm. O gel foi preparado a 7,5% (m/v) em poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 5%), contendo sacarose a 10% (m/v), anfólito pH 3,0-10,0 (Pharmalyte, GE Healthcare) a 2% (v/v), TEMED a 0,17% (v/v) e persulfato de amônio a 0,075% (m/v) foi adicionada ao sistema de placas. 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 termostatizado a 10℃ (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 a 1 M e o ânodo em ácido fosfórico a 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 60 V, 10 mA para 30 minutos, para a realização de uma pré-focalização por 30 minutos. Em seguida, moojenactivase (20 µg/10 µL) foram aplicadas diretamente no gel com a utilização de um pente e a focalização prosseguiu por aproximadamente 4 horas a 600 V, 5 mA. Padrões de focalização isoelétrica (IEF Standards, Bio-Rad) com proteínas apresentando faixa de pI 4,45 - 9,6, foram corridos em paralelo às amostras nas mesmas condições.

Após a focalização isoelétrica, foram desprezados 0,5 cm das laterais do gel e tiras de 1,0 x 0,5 cm foram seccionadas do mesmo, sendo colocadas em tubo 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. Assim, foi possível obter o valor de pH referente ao ponto em que a amostra de moojenactivase apresentou migração. O restante do gel contendo a amostra e padrão 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 a 0,1% (m/v) contendo metanol: ácido acético (50:10, v/v) e descorado em solução de ácido acético a 10% e metanol a 5%.

#### 3.2.4.3 Sequenciamento dos peptídeos trípticos da moojenactivase por espectrometria de massas

Os experimentos referentes a este item foram realizadas no Centro de Química de Proteínas da FMRP-USP em colaboração com o Prof. Dr. José César Rosa.

##### 3.2.4.3.1 Hidrólise tripsínica *in situ*

As amostras de moojenactivase destinadas para digestão com tripsina e consequente análise dos fragmentos por espectrometria de massas, foram obtidas a paritr da proteína isolada liofilizada ou a partir de bandas coradas com Coomassie Blue obtidas por SDS-PAGE. Inicialmente, as bandas de interesse do SDS-PAGE foram cortadas do gel com auxílio de bisturi utilizando uma placa de vidro limpa como suporte. Após a transferência das bandas a um tubo cônico de 1,5 mL, o SDS e corante Coomassie Blue foram removidos por 3 lavagens suscessivas com 400 µL de Ambic a 100 mM contendo 50% de acetonitrila (ACN – J.T. Baker), e em seguida, as amostras foram desidratadas com acetonitrila pura e secas em centrífuga rotatória à vácuo (SpeedVac, Savant). As bandas de gel secas e a amostra de moojenactivase liofilizada foram reidratadas com uma solução de tripsina (Promega) a 0,5 µg/20 µL e adicionado um volume de 50 µL de Ambic 100 mM, sendo incubado a 37℃ por 24 horas. Após 24 horas, a reação foi interrompida pela adição de 5 µL de ácido fórmico a 1% e mantida em temperatura ambiente para a extração dos peptídeos.

Os peptídeos trípticos das amostras foram preparados em coluna ZipTip contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems) previamente ativada com metanol e equilibrada com ácido fórmico a 0,2%. As amostras foram aplicadas à coluna, onde os sais e outros componentes hidrofílicos foram lavados

por 3 lavagens com 100 µL de ácido fórmico a 0,2%, e sendo os peptídeos aderidos à resina, eluídos com 30 µL de uma solução de metanol 60% em ácido fórmico a 5%. As amostras foram secas em SpeedVac para que pudessem ser diluídas em matriz apropriada para análise por MALDI-ToF-ToF ou ESI Q-ToF.

**3.2.4.3.2 MALDI-ToF-ToF**

Para a análsie em sistema Maldi, as amostras dos peptídeos trípticos foram suspendidas em 6 – 10 µL da matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (5mg/mL em 0,1% ácido trifluoracético / 50% ACN) e aplicados 2 µL na placa de Maldi para a análise. A placa foi analisada em espectrômetro de massas MALDI-ToF/ToF (Axima Performance, Shimadzu), com aquisição automática dos espectros MS e MS/MS para os íons mais abundantes. Os espectros MS foram obtidos automaticamente no modo Reflectron Positivo e os íons de maior intensidade foram automaticamente selecionados para a colisão induzida, obtendo-se assim os espectros de fragmentação MS/MS.

**3.2.4.3.3 ESI Q-ToF**

Para análise por espectrometria de massas com ionização por *electrospray (*ESI – do inglês *Electrospray Ionization*) em sistema ESI Q-ToF, a amostra foi diluída em 20µL de ácido fórmico a 0,1% com 5% de acetonitrila. As amostras foram submetidas à separação por UPLC (Waters) com uma coluna capilar de fase reversa C18, acoplado diretamente à fonte de ionização. Os solventes foram A= ACN a 5% em ácido fórmico a 0,1% e solvente B= ACN a 95% em ácido fórmico a 0,1%, com fluxo de 200-400nL/minuto, com um gradiente linear crescente de solvente B. Os peptídeos foram analisados “online” em uma fonte “electrospray” acoplado a um espectrômetro de massas Q-TOF (ESI-Q-TOF-MS - Waters). Para isto utilizou-se uma voltagem de 3,5kV para a fonte de ionização, um “cone voltage” de 40V, e a temperatura da fonte de 100ºC. Os espectros foram coletados no modo “data–dependent acquisition”, e processados pelo programa Mass Lynx 4.0. Os peptídeos fragmentados por colisão induzida (CID-MS/MS) foram coletados automaticamente, sendo selecionados pelos íons mais intensos durante um determinado tempo da cromatografia.

#### 3.2.4.3.4 Identificação dos peptídeos obtidos utilizando o software MASCOT

Os espectros obtidos por ambas as técnicas de espectrometria, foram processados e submetidos a um banco de dados para identificação das proteínas, utilizando o programa Mascot versão 2.2.04 e o banco de dados NCBi, tendo como parâmetros: enzima tripsina com perda de 1 clivagem (*missed cleavage*), modificação fixa para carbamidometil-Cys (*carbamidometyl*) e modificações variáveis para oxidação de Metionina, e fosforilação para Ser, Thr e Tyr. Para excluir identificações falso positivas (FDR) os espectros de massas foram submetidos ao banco de dados no modo reverso, nível de significância estatística de $p<0,05$ que corresponde a um erro permitido de 5%, um escore para peptídeos >35.

### 3.2.4.4 Análise *in silico*

As sequências de aminoácidos obtidas dos peptídeos trípticos foram submetidas a alinhamento múltiplo com outras sequências de moléculas homologas depositadas nos principais bancos de dados utilizando os programas FASTA (www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html) e BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi). Os alinhamentos foram realizados no programa Clustal X (versão 2.02)

### 3.2.4.5 Avaliação da presença de glicosilação

Com o objetivo de avaliar a presença de conteúdo de carboidrato, a deglicosilação da moojenactivase foi realizada utilizando enzima PGNase F ( do inglês *Peptide N-glycosidase F* - New England BiLabs) de acordo com instruções do fabricante. Cerca de 25 µg de moojenactivase (em 10 µL tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0) foi adicionada à 4 µL de tampão desnaturante (SDS a 0,5% e DTT a 40mM) a qual foi aquecida à 100ºC por 15 minutos. Em seguida, foram acrescentados 2 µL de tampão de reação G7 de reação, contendo tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,5, 2 µL de NP-40 à 10% e 1 µL de de solução contendo PGNase F a 500.000 U/mL. Como controle, 25 µg moojenactivase foi incubada com as mesmas soluções acima, com excessão da PGNase F (New England Biolabs). As soluções foram incubadas à 37ºC por 24 horas. O conteúdo proteico, deglicosilado (tratamento com PGNase F) e não deglicosilado (sem PGNase F), foi avaliado por SDS-PAGE (ítem 3.2.4.1.).

### 3.2.5 Atividades Funcionais *in vitro*

#### 3.2.5.1 Atividade proteolítica sobre caseína

A atividade proteolítica sobre a caseína bovina foi determinada de acordo com RODRIGUES et al. (2000), com alterações. Para avaliar a presença de metaloproteases, as frações obtidas nos processos cromatográficos foram previamente incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente na presença de 5 mM de EDTA ou 5 mM de $CaCl_2$ em tampão Tris-HCl a 100 mM em pH 8,0 em volume final de 0,25 mL. Após a incubação previa, 0,25mL de solução de caseína bovina a 1% (Sigma-Aldrich), solubilizada em tampão TRIS –HCl a 100 mM em pH 8,6, foram adicionados às frações e incubadas por 60 minutos a 37ºC. A reação foi interrompida pela adição de 0,75 mL de ácido tricloro acético (TCA) 30% e mantida por 30 minutos a temperatura ambiente, e posteriormente submetida à centrifugação a 13.000 x*g* por 10 minutos em centrífuga Eppendorf modelo 5804R (Eppendorf). Foi medida a absorbância do material sobrenadante a 280 nm em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Coulter). A atividade proteolítica é caracterizada pelo aumento na absorbância do meio, gerado pela ação proteolítica da enzima com consequente formação de peptídeos livres. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como o aumento de 0,001 unidade de absorbância em comprimento de onda de 280 nm por minuto de reação. As reações foram realizadas em duplicata e os resultados expressos pela média das Unidades de Atividade Proteolítica ± Erro Padrão Médio (EPM), para os grupos incubados com $CaCl_2$ (5 mM) ou EDTA (5 mM).

#### 3.2.5.2 Atividade de ativação de fatores da cascata de coagulação

##### 3.2.5.2.1 Atividade amidolítica

Essa técnica consiste em avaliar a capacidade das frações cromatográficas ou da moojenactivase de ativar zimogênios inativos (Fator X, Protrombina, Plaminogênio e Proteína C), gerando protease ativas (Fator Xa, Trombina, Plasmina e Proteína C ativada, respectivamente). A formação do produto ativo é observada pela reação desses produtos sobre substratos cromogênicos (S-2222, S-2238, S-2251 e S-2222, respectivamente) específico para cada uma das proteases formadas. Os substratos cromogênicos são peptídeos sintéticos que possuem uma

ligação peptídica entre um determinado aminoácido e um grupo p-Nitroanilina, a qual é hidrolisada por enzimas capazes de catalisar a quebra da ligação, liberando o radical p-Nitroanilina que é capaz de absorver luz no comprimento de onda em 405 nm, gerando uma coloração amarela (Fig. 11).

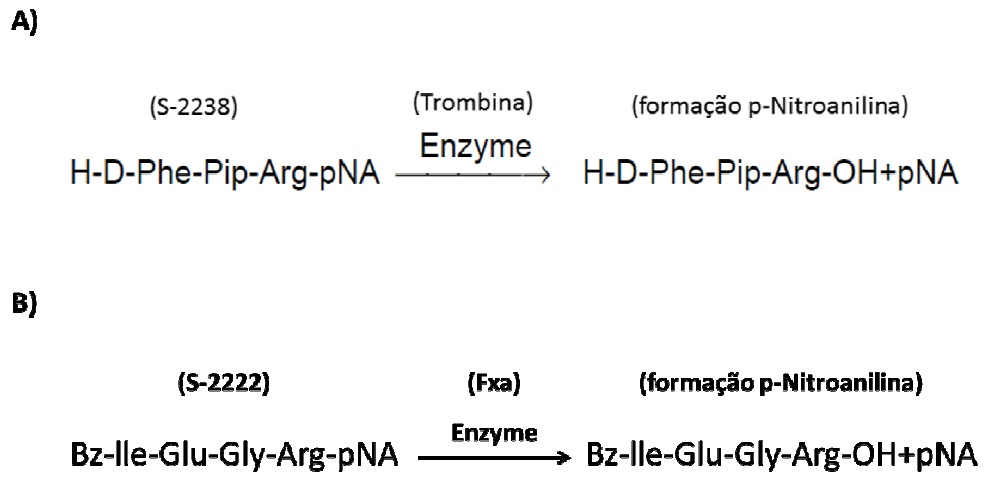



**Figura 11. Reação amidolítica.** Esquematização da reação amidolítica sobre substratos cromogênicos de acordo com o Manual dos produtos S-2238 e S-2222 (Chromogenix). pNA = para-nitroanilina.

**Fontes:** http://chromogenicsubstrates.com/downloads/chromogenic_substrates_s2238.pdf e http:// www.chromogenix.com/Products/pdf_ins/INS_EN_82%200316%2039.pdf

Segundo Modesto e colaboradores (2005), com modificações, o ensaio amidolítico consiste na incubação da amostra na presença de Fator X humano, protrombina humana, Proteína C humana (Calbiochem) ou Plasminogênio humano (Sigma) na concentração de 2,5µg/mL e substrato cromogênico S-2222, S-2238, S-2366 ou S-2251, respectivamente, na concetração de 0,4 mM. A reação foi realizada em tampão Tris-HCl 200 mM pH 7,4 contendo NaCl 100 mM em micro placa de 96 poços. Toda a reação foi monitorada pela medida da absorbância a 405nm, avaliando a formação de coloração amarela pela liberação de p-Nitroanilina livre, utilizando leitor de micro placa ELX808 BioTek (BioTek) com leituras sequenciais a cada 15 segundos por 30 minutos a 25ºC. Como controle, a ação direta da amostra sobre os substratos cromogênicos também foi monitorada a 405 nm nas mesmas condições acima, porém sem a presença dos fatores de coagulação (FII, FX,

Plasminogênio e Proteína C). Os valores das leituras das absorbâncias da curva de atividade amidolítica na presença de fatores foram subtraídos daqueles obtidos da curva na ausência de fatores, gerando uma curva resultante (absorbância x tempo) referente à verdadeira atividade de ativação dos fatores de coagulação. A partir dessa curva resultante, a atividade foi calculada pela medida da inclinação da porção inicial linear da curva, com até 20% do consumo do substrato colorimétrico, levando em consideração a linearidade dessa reta ($R^2$>0,97) a qual representa uma velocidade de reação constante. Assim, o valor de inclinação da reta corresponde a Unidade de Atividade Amidolítica sobre determiando substrato, sendo calculado pela relação ΔAbsorção/Δtempo(minutos) (Figura 12). Uma Unidade de Atividade Amidolítica (U) foi definida como o aumento de 0,001 unidade de absorbância a 405 nm por minuto de reação de hidrólise.

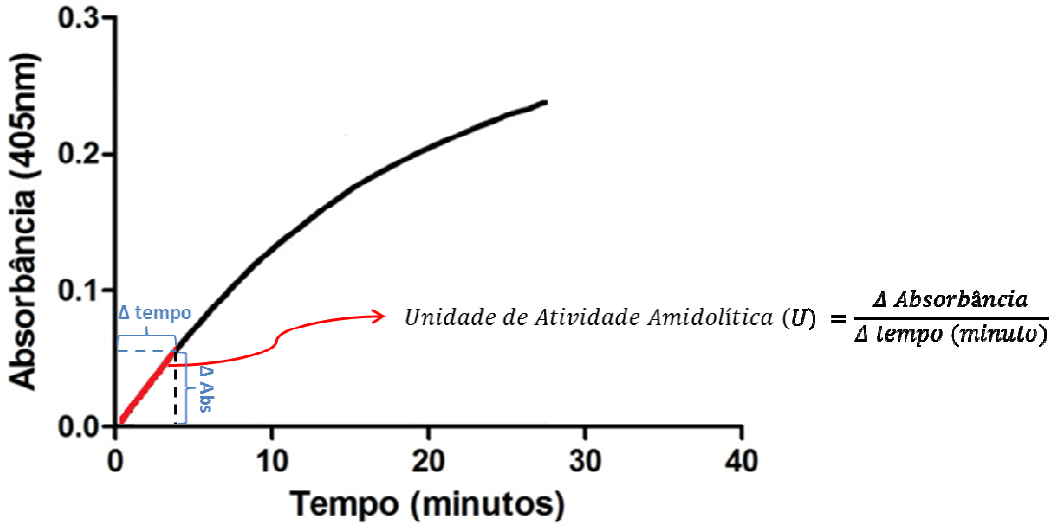



**Figura 12. Cálculo da atividade amidolítca a partir da curva de ativação de fatores da coagulação.**

Ilustração demonstrativa do gráfico que representa a curva resultante de atividade sobre fatores de coagulação. Em vermelho representa a porção inicial linear da curva (0 – 20 % consumo subrato cromogênico) com velecidade constante de atividade. A fórmula ao lado foi utilizada para o cálculo da Atividade amidolítica.

A Atividade de Ativação de Protrombina (AAP) ou Atividade de Ativação do Fator X (AAFx) foi determinada baseada nos valores de Atividade Amidolítica obtido, e da quantidade de enzima (fração cromatográfica ou protease isolada – mg) utilizada na reação. A AAP ou AAFx é caracterizada pela Atividade Amidolítica de

Ativação do fatore de coagulação em questão por mg de enzima (U/mg) segundo a fórmula:

$$Atividade\ Ativação\ Protrombina\ ou\ Fator\ X = \frac{Atividade\ Amidolítica\ (U)}{Moojenactivase\ (mg)}\ (U/mg)$$

Os resultados foram expressos pelo valor da Atividade de Ativação (U/mg) ± EPM.

**3.2.5.2.1.1 Ensaio de estabilidade e efeitos de íons e inibidores sobre a ativação de protrombina pela moojenactivase**

Para os ensaios de estabilidade, moojenactivase foi incubada em diferentes condições de pH e temperaturas. A estabilidade em diferentes condições de pH foi avaliada pela incubação da moojenactivase (4 µg/mL) por 30 minutos a 25ºC nas faixas de pH (3,5 – 10,5) em tampão acetato de sódio (pH 3,5 – 6,0) e Tris-HCl (7,0 – 10,5), todos a 50 mM. Já a estabilidade térmica foi avaliada pela incubação da moojenactivase-A (4 µg/mL) nas temperaturas de 4, 25, 37, 60 e 100ºC por 30 minutos.

Para avaliar os efeitos de íons divalentes sobre a atividade de ativação de protrombina, moojenactivase (4 µg/mL) foi incubada com soluções dos sais $BaCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $CuCl_2$, $MgCl_2$ e $MnCl_2$ todos a 5mM em tampão Tris-HCl a 50mM em pH 7,4. Já a avaliação do efeito de inibidores sobre a ativação de protrombina, moojenactivase (4 µg/mL) foi incubada com diferentes inibidores EDTA (5 mM), Benzamidina (20 mM), SDS (10 mM), Citrato de Sódio (13,6 mM), E-64 (10 µM), Fosforamidon (40 µM), Soro Anti-Ofídico polivalente anti botrópico/crotálico (1:20 m/m – Lema bioLOGIC), DTT (10 mM) e $\alpha_2$- macroglobulina (1:2 m/m - Sigma) em tampão Tris-HCl a 50 mM em pH 7,4.

Após a incubação nas diferentes condições de pH, temperatura, presença de íons e inibidores, o material incubado foi submetido à atividade amidolítica de ativação de protrombina, como descrito no início deste ítem (3.2.5.2.1.), em tampão Tris-HCl 200 mM pH 7,4. Os resultados, obtidos a partir da avaliação de condições de estabilidade e inibidores, foram expressos pela porcentagem de Atividade de Ativação de Protrombina quando comparado a um grupo controle para cada avaliação. Os dados foram expressos pela média da porcentagem ± EPM. As condições experimentais foram avaliadas em triplicata.

**3.2.5.2.1.2 Propriedades enzimáticas da moojenactivase**

A formação de Trombina ou Fator Xa pela reação da Moojencativase/ Protrombina ou Fator X foi monitorada pela incubação enzima/substrato por diferentes tempos. Inicialmente, Atividade de Ativação Amidolítica da moojenactivase sobre a Protrombina e Fator X foi determinada pela incubação da toxina (0,125 µg/mL) com o Fator X ou Protrombina (2,5µg/mL), por diferentes tempos (3; 7,5; 15; 30; 60 e 90 minutos) sendo a reação parada pela adição de solução de EDTA (5mM). Em seguida, os substratos S-2238 ou S-2222 foram acrescentados (concentração final 0,4 mM) e a reação do produto formado (Trombina ou Fator Xa) ocorrendo e monitorada nas mesmas condições citadas no início do ítem 3.2.7.2.1. Para a determinação da Atividade Amidolítica do Fator X foi realizada uma pequena adaptação durante o ensaio onde, logo após a adição do reagente EDTA, foram acrescentados solução de $CaCl_2$ (concentração final 40 mM) e deixado por 2 minutos e em seguida, acrescentado o substrato S-2222 para o início da monitorização da reação. Esse procedimento foi realizado uma vez que o Fator Xa é uma serinoprotease dependente de íons cálcio e a recalcificação se faz necessária tendo em vista que a adição de EDTA necessária para inibir a reação moojenactivase-Fator X é responsável por quelar íons metálicos. Uma vez obtido os valores de Atividade Amidolítica de ativação da Protrombina ou Fator X para cada tempo de reação, esse valor foi comparado a uma curva de Atividade Amidolítica dos fatores ativados isoladamente (trombina e fator Xa, onde serão descritas a seguir), sendo assim determinada a concentração do produto gerado (trombina ou Fator Xa - nM) pela reação moojenactivase-Protrombina ou moojenacativase-Fator X no diferentes tempos de incubação.

Ainda, a Atividade Específica da moojenactivase para os substratos Protrombina e Fator X foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$Atividade\ específica\ (Protrombina\ ou\ Fator\ X) = \frac{nmoles\ do\ produto\ formado\ (Trombina\ ou\ Fator\ Xa)}{tempo\ de\ reação\ (minuto) x\ \mu g\ Moojenactivase}$$

A Atividade Específica é expressa pela quantidade de produto formado (nmols de trombina ou fator Xa) por tempo de reação (minutos) a uma determinada quantidade da enzima (moojenactivase - mg), sendo o valor expresso pela média da Atividade

Específica (AE - nmols. $min^{-1}$. mg) ± EPM após 5 minutos de incubação moojenactivase/Protrombina ou moojenactivase/Fator X.

**Curva de Atividade Amidolítica da Trombina e Fator Xa**

Para obtenção das curvas de atividade da trombina (Sigma) e do Fator Xa (o Fator Xa foi obtido segundo metodologia que será descrita a seguir), diferentes concentrações conhecidas das enzimas (1,56 – 50 nM de trombina e 1,62 – 100 nM de Fator Xa) foram incubadas na presença de 0,4 mM dos substratos cromogênicos S-2238 ou S-2222, respectivamente, e a reação monitorada nas mesmas condições citadas no início do ítem 3.2.7.2.1. Os resultados foram representados por um gráfico, no qual o eixo X representa a concentração da enzima (nM) e o eixo y os valores de Unidades Atividade Amidolítica (U). As reações foram realizadas em triplicata e os valores representados pela média ± EPM.

**Obtenção Fator Xa**

O Fator X ativado (FXa) foi produzido e isolado a partir da reação da moojenactivase e fator X

**Imobilização da moojenactivase em resina Sepharose 4B**

Inicialmente, a moojenactivase foi imobilizada à resina pré-ativada CNBr-Sepharose 4B ativada (Ge healthcare), capaz de imobilizar ligantes que contenham aminas primárias (proteínas como a moojenactivase) pela reação com brometo de cianogênio, de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, cerca de 6 mg de resina liofilizada foi ressuspendidas em 1 mL de solução HCl 1mM em um tubo cônico de 1,5 mL para a ativação da resina. Após 30 segundos, o material foi centrifugado a 300 x*g* por 5 minutos em centrífuga Eppendorf modelo 5804R e o material sobrenadante descartado e acrescentado mais 1 mL de solução HCl 1 mM ao *pellet* de resina e deixado por mais 30 segundos. Esse procedimento de lavagem da resina foi repetido por mais 4 vezes. Após o último passo, o material sobrenadante foi descartado e o *pellet* de resina ressuspendido com 1 mL de solução de acoplamento de carbonato de sódio ($NaHCO_3$) a 100 mM em pH 8,3 contendo NaCl 500 mM e lavada (por processo de centrifugação, como descrito acima) por 3 vezes com essa solução. Após a última lavagem, o sobrenadande foi descartado e ao *pellet* correspondendo à cerca de 100 µL de suspensão de resina,

foram acrescentados 200 µL de solução de moojenactivase (400 µg/mL em tampão de acoplamento). A reação de acoplamento moojenactivase-Sepharose ocorreu por 12 horas à 4ºC sob constante agitação. Após a incubação, o meio foi lavado por 3 vezes com tampão de acoplamento. Em seguida, com o objetivo de bloquear qualquer grupo com brometo de cianogênio ativo ainda disponível na resina, à suspensão de moojenactivase-Sepharose (100 µL) foram acrescentados 200 µL de solução glicina (25 mg/mL em tampão de acoplamento - Sigma) e deixados incubando por 2 horas a temperatura ambiente e sob constante agitação. Após a incubação, o meio foi lavado com solução Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e condicionado a 4ºC até o momento da experimentação.

**Formação de Fator Xa**

A reação entre moojenactivase-Sepharose e Fator X ocorreu pela adição de 200 µL de solução Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo 50 µg Fator X e Benzamidina 20 mM (Sigma) à suspensão de moojenactivase-Sepharose. Após diferentes períodos de incubação (1, 5, 10, 30 e 60 minutos) A 37ºC sob constante agitação, o material foi centrifugado a 3000 x*g* por 30 segundos (centrífuga Eppendorf modelo 5804R – Eppendorf) e uma alíquota do sobrenadante foi retirada e submetida a eletroforese SDS-PAGE (item 3.2.4.1) para o acompanhamento da formação do Fator Xa.

**Isolamento do Fator Xa**

Para o isolamento do Fator Xa, moojenactivase-Sepharose e Fator X foram incubados nas mesmas condições acima, onde após uma hora o material sobrenadante (contendo Fator Xa) foi coletado. O material sobrenadante obtido a partir de dois processos de formação de Fator Xa foi então submetido a um processo de troca de tampão para Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (não contendo Benzamidina) utilizando sistema Centricon com limite de separação de 9 kDa (Pierce) sendo todo o procedimento realizado a 4ºC e segundo instruções do fabricante. Após a troca de tampão, o material foi imediatamente submetido a cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Benzamidina FF High Sub (coluna com 1 mL de volume de resina - GE Healthcare). Brevemente, o procedimento cromatográfico foi realizado em sistema AKTA FPLC (GE Healthcare), sendo aplicado à coluna 500 µL do material contendo Fator Xa. O procedimento de lavagem do material não aderido à coluna foi feito com tampão Tris-HCl a 50 mM em

pH 8,0 contendo NaCl 300 mM. Após a estabilização da linha de base, a eluição do material aderido foi feita com tampão Glicina a 50 mM em pH 3,5. Todo o procedimento de lavagem e eluição foi realizado em um fluxo de 1 mL/minuto. O material eluído foi coletado em coletor automático Frac-920 (GE Healthcare) com frações de 0,5 mL/tubo. O procedimento foi monitorado pela medida da absorbância do material eluído a 280 nm. O material eluído que interagiu com a resina (correspondendo ao FXa), foi submetido a troca de tampão glicina para Tris-HCl 50 mM pH 8,0 utilizando sistema centricon como descrito acima. Os picos foram analisados quanto ao conteúdo de proteínas por SDS-PAGE (item 3.2.4.1.) e atividade amidolítica sobre substrato S-2222 (ítem 3.2.5.2.1.).

**3.2.5.2.2 Atividade proteolítica sobre Protrombina, Fator X e Fibrinogênio**

Essa atividade tem como objetivo analisar a formação dos produtos de fragmentação da Protrombina humana (FII), Fator X humano (FX) (Calbiochem, EUA) e Fibrinogênio humano (Fib) (Sigma). A moojenactivase foi incubada com FII, FX ou Fib na razão moojenactivase/substrato de 1:20 (m/m) (20 µg FII, FX + 1 µg enzima ou 10 µg Fib + 0,5 µg Enzima, em volume final 10 µL) em solução Tris-HCl 20mM, pH 7,4 a 37ºC por diferentes tempos. Após cada tempo de incubação, foram acrescentados 10 µL de tampão de amostra contendo agente redutor (β-mercaptoetanol a 5%) para eletroforese (item 3.2.4.1.) e em seguida fervida a 100ºC por 10 minutos. As amostras foram aplicadas em SDS-PAGE (item 3.2.4.1.) e os fragmentos foram analisados pela visualização das bandas coradas por Coomassie Blue e suas respectivas massas moleculares comparadas com possíveis fragmentos gerados pela clivagem da protrombina citados na literatura (FISCHER et al., 1996; KINI, 2005b; FRIEDRICH et al., 2006; BERGER et al., 2008).

**3.2.5.2.3 Análise da sequência N-terminal de aminoácidos a partir de fragmentos proteolíticos da Protrombina e Fator Xa**

Com o objetivo de avaliar o possível sítio de clivagem pela moojenactivase sobre os substratos Protrombina e Fator X, o fragmento principal, formado a partir da incubação enzima/substrato, foi analisado através da composição N-terminal de aminoácido. Brevemente, moojenactivase/Protrombina e moojenactivase/Fator X foram incubados nas mesmas proporções citada no ítem acima (ítem 3.2.5.2.2.), onde após 1 hora de incubação a 37ºC, o material foi submetido à eletroforese SDS-

PAGE (item 3.2.4.1.). Após a corrida eletroforética, o material no gel foi então submetido a um processo de transferência para uma membrana Hybond 0,22µm de fluoreto de polivinilideno (PVDF – do inglês *Polyvinylidene fluoride*) (Amersham Biosciences) por uma hora a 100 Volts (350 mAmperes) em tampão Tris-HCl a 50 mM contendo Glicina a 20 mM e 20% de metanol. Todo o procedimento foi realizado em sistema MiniPROTEAN Tetra Cell (BioRad) e sob refrigeração com gelo moído. A eficiência da eletrotransferência foi avaliada pela coloração das membranas transferidas com o corante Comassie Brilliant Blue G-250 (0,025%) em metanol a 50%. Em seguida, as membranas foram expostas a solução descorante (metanol: água MilliQ 50%) e o excesso removido. As bandas dos produtos de clivagem, que representavam os fatores ativados (trombina e fator Xa), foram recortadas e o material submetido à análise do sequenciamento N-terminal de amino ácidos.

Para o seqüenciamento N-terminal, as amostras das bandas de transferência foram submetidas ao seqüenciador automático PPSQ-33A (Shimadzu). Os aminoácidos phenylthyoidantoina derivados (PTH-aminoácidos), a partir da reação de clivagem por degradação de EDMAN, foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos 20 PTH-aminoácidos padrão. A seqüência obtida da proteína foi comparada com as seqüências de outras proteínas relacionadas na base de dados utilizando o programa BLAST FASTA.

#### 3.2.5.3 Atividade coagulante

A avaliação do potencial coagulante da moojenactivase foi realizada pelo ensaio de coagulação sobre plasma humano ou sobre fibrinogênio.

##### 3.2.5.3.1 Ensaio de coagulação plasmática

Para o ensaio, foram utilizados plasma pobre em plaquetas (PPP) humano.

**Obtenção do PPP**

Sangue humano periférico, cerca de 10 mL coletados de cada um dos 5 doadores utilizando tubos contendo citrato de sódio a 105 mM (ítem 3.1.2.), foi submetido à centrifugação a 180 x*g* por 10 minutos em centrífuga Eppendorf modelo 5804R (Eppendorf) para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, o cerca de 5 mL de PRP obtido foi submetido a uma nova etapa de centrifugação a 1125 *g* por 15 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). O

PPP de cada doador (cerca de 3,5 à 4 mL) foi avaliado quanto aos parâmetros de coagulação pelos testes de Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa), para a confirmação da qualidade do plasma coletado.

**Determinação do TP**

O TP foi determinado utilizando o reagente Soluplastin® (Wiener Lab) de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, 100 µL de PPP de cada doador foram acrescentados à 200 µL do reagente A do kit (contendo tromboplastina de cérebro de coelho, $CaCl_2$ a 12,5 mM e NaCl a 100 mM), ambos previamente incubados separadamente a 37ºC por 3 minutos, e a reação de coagulação monitorada automaticamente em aparelho CloTimer (CLOT). Todo o procedimento foi realizado a 37ºC.

**Determinação TTPa**

Os experimentos foram realizados utilizando o reagente APTTest® (Wiener Lab) de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, 100 µL do PPP mais 100 µL do reagente A do kit (contendo cefalina com ácido ellágico como ativador particulado) foram incubados por 3 minutos a 37ºC. Após a incubação, a reação de coagulação foi iniciada pela adição de 100 µL do reagente B contendo $CaCl_2$ 25 mM. A medida do tempo de coagulação monitorada automaticamente em aparelho CloTimer (CLOT). Todo o procedimento foi realizado a 37ºC. Os valores do tempo de coagulação para os dois testes (TP e TTPa) foram comparados aos valores de referência segundo instruções do fabricante, onde foram considerados normais os PPP com o tempo de protrombina com valores entre 10 – 14 segundos e o tempo de tromboplastina parcialmente ativada com valores entre 30 – 43 segundos.

**Ensaio de coagulação plasmática**

À 150 µL de PPP humano ou PPP humano deficiente em Fator X (Stago) foram acrescentados 25 µL de diferentes concentrações de moojenactivase diluída em PBS (do inglês *Phosphate Buffer* Saline) obtendo-se concentrações finais da protease no plasma de 80 – 0,078 µg/mL. Ambas as soluções de PPP e Mojenactivase foram previamente incubadas a 37ºC antes de serem acrescentadas à reação. A medida do tempo de coagulação foi monitorada automaticamente em aparelho CloTimer (CLOT) onde a reação foi iniciada no momento em que 25 µL da

protease foram acrescentados ao PPP normal ou deficiente em Fator X. Todo o procedimento foi realizado a 37ºC. Os resultados foram expressos pela média dos tempos de coagulação (segundos) ± EPM por concentração de moojenactivase (n = 3).

**3.2.5.3.2 Ensaio de atividade coagulante sobre fibrinogênio**

Paralelamente ao ensaio de coagulação plasmática, também foi avaliada a capacidade da moojenactivase em induzir a formação de coágulo de solução de fibrinogênio humano (3 mg/mL em salina fisiológica NaCl a 0,9% - Sigma). O experimento foi realizado nas mesmas condições e concentrações da enzima utilizadas para o PPP, e a formação da rede de fibrina também foi monitorada em coagulômetro. Como controle positivo de indução de coagulação da solução de fibrinogênio foi utilizada Trombina humana (0,5 Unidades de atividade NIH/ 25 µL PBS). Os resultados foram expressos pela média do tempo de coagulação (segundos) ± EPM por concentração de moojenactivase ou trombina (n=3).

**3.2.5.4 Atividade Fibrinolítica**

O ensaio de atividade fibrinolítica foi realizado de acordo com método descrito por Leitão *et al*. (2000). Brevemente, duas placas de fibrina foram preparadas pela homogeneização de volumes iguais da solução de fibrinogênio bovino (0,6% m/v) e agarose (1,9% m/v), ambas diluídas em tampão barbital a 0,05 M em pH 4,6, contendo $CaCl_2$ a 1,66 mM, $MgCl_2$ a 0,68 mM e NaCl a 94 mM. À mistura fibrinogênio/agarose foram acrescentados 100 µL de Trombina humana a 1µg/mL (Sigma) para formação do coágulo e consequente formação da rede de fibrina. As placas foram mantidas a 4ºC por 30 minutos e em seguida foram feitos poros de cerca de 5mm de diâmetro no gel de fibrina para a aplicação das amostras. Para determinar a atividade fibrinolítica, alíquotas de 20 µL contendo diferentes quantidades de moojenactivase-A (50, 25, 12,5 e 6,25 µg) foram adicionadas às cavidades e em seguida as placas foram incubadas por 18 horas a 37ºC. Como controle positivo, foi utilizado Plasmina (20 mU por cavidade), e como controle negativo foram aplicados PBS apenas nas cavidades. A atividade fibrinolítica foi avaliada pela medida da formação de halos transparentes de lise (pela mensuração do diâmetro em mm) formados pela degradação da rede de fibrina presente na

placa. Os resultados foram expressos pela média das medidas do diâmetro do halo formado ± EPM, sendo n = 4 para cada grupo.

**3.2.5.5 Agregação plaquetária**

A avaliação do efeito da moojenactivase sobre plaquetas *in vitro* foi realizada com plaquetas humanas lavadas (PL).

**Obtenção suspensão de plaquetas lavadas (PL)**

Para os experimentos de agregação plaquetária utilizando plaquetas humanas lavadas (isto é, solução de plaquetas sem a presença do plasma contendo os fatores de coagulação) o PPP, obtido da centrifugação como descrito no ítem 3.2.5.3.1., foi coletado para os experimentos de coagulação e o *pellet* de plaquetas foi ressuspendido em tampão de lavagem contendo NaCl 103 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, Ácido cítrico 36 mM, albumina bovina sérica (BSA – do inglês *Bovine serum* albumin) 0,35%, glicose 5 mM e Ácido bis-(aminoetil)glicoléter-tetracético (EGTA – do inglês *ethylene glycol tetraacetic acid*) 2 mM. O procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez, onde ao final o sobrenadante foi retirado e as plaquetas foram ressuspendidas em tampão de ressuspensão contendo NaCl 103 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, Ácido cítrico 36 mM, BSA 0,35%, glicose 5 mM e HEPES 3,8 mM. A concentração final da suspensão de plaquetas humanas foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer a partir de uma alíquota da suspensão de plaquetas diluida em solução de oxalato de amônio 1%, sendo a concentração da suspensão final de 300 plaquetas / µL (ZINGALI & FRATTANI, 2007).

**Ensaio de agregação plaquetária**

O ensaio de agregação plaquetária foi realizado usando agregômetro ótico (Chrono-Log Corporation) segundo técnica descrita por Born & Cross (1963), o qual descreve a monitorização do processo de agregação turbidimetricamente. Para o ensaio, 450 µL da suspensão de PL foram incubados em cubetas de vidro siliconizadas a 37ºC sob agitação com barra magnética à rotação de 300x*g* por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 µL de solução $CaCl_2$ 1 M e após 1 minuto, 50 µL de solução contendo diferentes concentrações da moojenactivase (6,125; 9,18; 12,5 e 25 µg/mL - concentração final do ensaio), moojenactivase (12,5 µg/mL) na presença de EDTA (10 mM) e moojenactivase (6,125 µg/mL) pre incubada por 5 minutos com Protrombina (2,5 µg/mL). A reação foi monitorada por 8

minutos após a adição das amostras. Como controle positivo foi utilizada Trombina humana (1 Unidade / 50 µL). O ensaio foi realizado em triplicata para cada grupo experimental e os resultados foram expressos pela média das porcentagem de agregação ± EPM.

**3.2.5.6 Estimulação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)**

Com o objetivo de avaliar o envolvimento da moojenactivase na expressão do fator tecidual (Fator III da cascata de coagulação) e sua função pró coagulante, assim como avaliar a estimulação da expressão da citocina proinflamatória TNF-α, PBMC foi tratado com diferentes concentrações da protease e os mediadores avaliados como descrito a seguir.

**3.2.5.6.1 Obtenção de leucócitos mononucleares de sangue humano periférico**

Cerca de 10 mL de sangue foram coletados em tubos heparinizados e transferidos para um tubo de 50 mL onde foi acrescentado o mesmo volume (~10 mL) de PBS em temperatura ambiente. Após homogeneização cuidadosa, a solução sanguínea foi distribuída em 4 tubos, sendo colocados 5 mL dessa solução em cada tudo. A essa mistura, foram acrescentados 5 mL de Histopaque–1077 (Sigma-Aldrich) que é uma solução contendo polissacarose e diatrizoato de sódio, ajustado a uma densidade de 1,077 g /mL, facilitando a recuperação de um grande número de células mononucleares viáveis (monócitos e linfócitos), que formam uma camada distinta entre as hemácias e o plasma. Após homogeneização, todo o material foi centrifugado a 756 x*g* por 20 minutos em centrífuga Eppendorf modelo 5804R (Eppendorf) e a fase contendo os leucócitos mononucleares (PBMC – do inglês *Peripheral Blood mononuclear Cells*) foi retirada com a ajuda de uma pipeta Pasteur. Estes foram reunidos em um tubo e centrifugados a 900 x*g* por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspendido em 5 mL de PBS. Em seguida, o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspendido com aproximadamente 5mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF - Invitrogen). A contagem do número de células em câmara de Neubauer foi feita na presença do corante Turk e a proporção de PBMC foi feita através de análise diferencial de células pelo esfregaços (preparados por centrifugação de 50 µL da solução de PBMC em citospin) corados com corante

pancrômico de Rosenfeld. A suspensão de PBMC obtida para os experimentos continha mais de 97% de mononucleares viáveis.

**3.2.5.6.2 Avaliação do potencial citotóxico de PBMC tratados com moojenactivase**

Inicialmente foi realizado um ensaio para avaliar uma possível ação citotóxica da moojenactivase sobre os PBMC (obtidos segundo ítem 3.2.5.6.1. acima) pelo método de viabilidade celular medido pela redução do MTT (3-(4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5- difenil brometo de tretrazolium) (MOSMANN, 1983). Para o teste, placas de 96 poços foram utilizadas de modo que os 3 primeiros poços foram utilizados para a leitura do branco e portanto, não receberam células e tratamento. No restante dos poços foram plaqueados $5x10^4$ células/poço, com um volume final de 50 µL ($5x10^5$ células/mL concentração final) em tampão RPMI completo contendo 10% de soro bovino fetal (SBF). Após o plaqueamento, os PBMC foram tratados pela adição de 50 µL de solução da moojenactivase (ressuspendida em meio RPMI) apresentando concentrações finais de 25, 5, 1 e 0,2 µg/mL e foram incubadas por 24 horas à 37ºC com 5% de $CO_2$, até a análise. Cisplatina (1 mg/mL - Darrow) foi utilizado como agente controle de indução de morte celular. O controle negativo recebeu nenhum tratamento. Após 24 horas de tratamento, os poços receberam 10µL de MTT (menos os poços do branco) e foram incubados por 3 horas a 37ºC e 5% de $CO_2$. Em seguida, as placas foram centrifugadas por 5 min a 900 x*g* e posteriormente invertida para o descarte do sobrenadante e adicionados 100µL de DMSO (dimetil sulfóxido) e levados à agitação até a total dissolução dos cristais por aproximadamente 20 minutos. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância dos poços em 570 nm (MOSMANN,1983). Os resultados de absorbância dos grupos controle (tratamento com RPMI apenas) corresponderam à 100% de viabilidade celular, onde grupos tratados com a protease foram comparados e suas percentagens de viabilidade calculadas. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada grupo experimental a partir de dois experimentos independentes (total n = 6). Os resultados foram expressos pela média da porcentagem de viabilidade celular ± EPM.

**3.2.5.6.3 Estimulação de PBMC com moojenactivase**

PBMC foi plaqueado em placa para cultura de 24 poços com fundo chato (TTP) a uma concentração final de $5x10^5$ células/mL em volume final de 1 mL. Essas células foram tratadas com diferentes concentrações de moojenactivase (0,2; 1; 5 e 25 µg/mL concentração final), lipopolissacarídeo 100 ng/mL (LPS isoldado de E.coli sorotipo 0111:B4 – Sigma), moojenactivase 25 µg/mL previamente incubada com EDTA (5 mM) por 10 minutos, moojenactivase 25 µg/mL previamente incubado à 100ºC por 30 minutos, e controle apenas com RPMI. Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 37ºC e 5% de $CO_2$ por 24 horas. Após a incubação, o material sobrenadante contendo células não aderentes e meio tratado foi coletado, centrifugado por 5 minutos a 1125 x*g* e o sobrenadante armazenado em *freezer* a -80ºC para futuras análises de produção da citocina TNF-α e fator tecidual. O *pellet* de células foi recolhido assim como as células aderentes no poço de tratamento. As células aderentes foram recolhidas após adição de solução PBS gelada e a placa estabilizada a 4ºC para a desaderência dessas células. Assim, após a coleta das células aderentes e não aderentes do mesmo poço de tratamento, essas foram submetidas a dois procedimentos suscessivos de lavagens pela adição de PBS, centrifugação a 1125 x*g* por 5 minutos e descarte do material sobrenadante. Após as lavagens, as células foram mantidas em tubos submergidos no gelo até o momento dos experimentos de atividade pró coagulante. Paralelamente, para a detecção da expressão de fator tecidual, os PBMC coletados em cada grupo experimental foram lisados com solução de lise contendo Tris-HCl a 20 mM, NaCl a 150 mM, EDTA a 1 mM, EGTA a 1 mM, Tergitol tipo NP-40 a 0,5%, pirofosfato de sódio a 2,5 mM, ortovanadato de sódio a 1 mM e Fluoreto de fenilmetilsulfonila a 0,5 mM (PMSF – do inglês *Phenylmethanesulfonyl fluoride*). A cada $1x10^6$ celulas foram acrescentados 100 µL do tampão de lise. Após sucessivas lavagens com pipeta e agitação, o material foi centrifugado por 5000 x*g* por 10 minutos e retirada uma alíquota do sobrenadante para dosagem de proteína pela técnica do BCA (ítem 3.2.2.2.) e o restante do material foi armazenado em *freezer* a -80ºC, para análise da produção do fator tecidual.

**3.2.5.6.4 Atividade pró coagulante dos PBMC tratados com a protease isolada**

As células (aderentes e não aderentes) obtidas da cultura de PBMC frente a diferentes estímulos (ítem 3.2.5.6.3.) foram ressuspendidas em volume final de 50

µL em PBS estéril. O ensaio de coagulação foi realizado conforme prodimento descrito no ítem 4.2.6.3, com modificações. Brevemente, a 100 µL de PPP humano, obtido segundo metodologia 3.2.5.3.1., foram acrescentados 50 µL da suspensão de PBMC e incubado a 37ºC por 10 minutos. Após a incubação, 50 µL de solução de CaCl2 (30 mM concentração final) foram acrescentados para início do processo de coagulação. A medida do tempo de coagulação foi monitorada automaticamente em aparelho CloTimer (fabricante CLOT). Todo o procedimento foi realizado a 37ºC. Os resultados foram expressos pelo tempo de coagulação (segundos) ± EPM. O controle negativo será representado pelo tempo de coagulação das células PBMC tratadas apenas com o meio de cultura RPMI. Os experimentos foram realizados em triplicata experimental em dois experimentos independentes.

**3.2.5.6.5 Detecção da citocina proinflamatória TNF-α e Fator Tecidual**

Pelo método de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), foi feita a detecção e quantificação da citocina TNF-α (Quantikine - R & D), além do fator tecidual (fator III da coagulação - FIII) (Human Coagulation Factor III/Tissue Factor DuoSet - R & D). A metodologia foi realizada como descrita pelo fabricante. Brevemente, os anticorpos de captura para cada citocina e FIII foram diluídos em tampão PBS e adicionados 100 µL/poço, na concentração indicada pelo fabricante. Após incubação das placas durante uma noite a 4ºC, as mesmas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo Tween-20 a 0,05%). Após as sucessivas lavagens, foram adicionados 200µL/poço de tampão de bloqueio (PBS contendo BSA a 1% em pH 7,4) seguido de incubação à temperatura ambiente por uma hora. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados 3 vezes com tampão de lavagem, e então adicionados 50µL/poço das amostras do sobrenadante de cultura de células (dosagens TNF-α e FIII) ou lisado celular (dosagem FIII). Paralelamente, foi também adicionado 50 µL de diferentes concentrações do padrão em poços separados para a determinação da concentração das amostras. Após uma hora e meia, o processo de lavagem das placas foi repetido por mais três vezes. Em seguida foram adicionados 100 µL/poço dos anticorpos de detecção biotinilados, diluídos em tampão de bloqueio (contendo BSA a 3 %) por 2 horas. Após a incubação, o ciclo de lavagem foi repetido, e em seguida acrescentados 100 µL/poço de solução contendo streptoavidina conjugada com peroxidase e incubados por 30 minutos em ambiente escuro. Após, a placa foi novamente lavada, e em seguida

foram acrescentados mais 100 µL do substrato (para a amplificação das reações) contendo tetrametilbenzidina (TMB) seguido de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente e fora do alcance de luz. Após esse período, as reações foram bloqueadas adicionando 50 µL/poço de solução ácido sulfúrico 2N. A densidade ótica (D.O.) dos poços da placa foi avaliada em leitor de microplacas em comprimento de onda de 450nm (Metertech Inc., modelo 960) e a concentração da citocina ou FIII calculada a partir de sua respectiva curva-padrão.

### 3.2.6 Atividades Biológicas *in vivo*

O envolvimento da moojenactivase em funções biológicas foi avaliado pelos ensaios de hemorragia local e alterações nos parâmetros hemostáticos e hematológicos.

#### 3.2.6.1 Atividade hemorrágica local

A determinação da capacidade de indução de homarragia local foi determinada segundo método descrito por NIKAI et al. (1984). Camundongos Balb/C machos, pesando 20 – 25 g e mantidos sob condições descritas no ítem 4.1.3., foram anestesiados com solução cetamina/xilasina (80 mg Cetamina + 15 mg Xilasina/ por Kg do animal). Após a confirmação do estado de inconsciência, 100 µL de solução contendo de 40, 20, 10 ou 5 µg de moojenactivase ou 10 µg de peçonha bruta de *Bothrops moojeni* diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) estéril foram injetadas intradermicamente no dorso dos camundongos. Após 3 horas da administração, os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, onde, em seguida, a pele (com cerca de 5 centímetros de diâmetro a partir do ponto de administração) foi removida e o halo hemorrágico formado na face interna da pele foi medido por dois diâmetros formando ângulos retos e expressos em mm. O grupo de animais administrado com solução salina constituíu o controle negativo. Os dados foram expressos pela média do diâmetro mensurado ± EPM com n = 4, para cada grupo de tratamento.

#### 3.2.6.2 Alterações hemostáticas e hematológicas

O envolvimento da moojenactivase no processo hemostático e hematológico foi avaliado a partir de alterações de sangramento, coagulação e parâmetros hematológicos em ratos Wistar (machos e fêmeas pesando aproximadamente 250 g)

administrados i.v. com a protease. As condições de manutenção dos animais estão descritas no ítem 3.1.3.

Inicialmente, para a administração da moojenactivase ou salina estéril, os animais foram colocados em um contensor, para garantir a imobilidade, mas com a cauda disponivel para o manuseio. A cauda foi então imersa em água a 37ºC por 2 minutos para causar um estado de hiperemia no local para facilitar a visualização das veias caudais para a administração intra venosa (i.v.). Em seguida, no local de administração, foi realizada assepsia com solução de etanol 70%. Após assepsia, a administração foi realizada através da injeção na veia lateral caudal na porção distal da mesma (cerca de 1/3 da porção distal) utilizando seringa de insulina (1 mL) com agulha de 0,45 x 13 mm. Após a administração, o animal foi colocado em uma caixa separadamente até a avaliação do tempo de sangramento ou coleta do material sanguíneo.

**3.2.6.1.1 Tempo de sangramento**

Para o experimento de tempo de sangramento, diferentes doses de moojenactivase (1, 3, 10 e 30 µg de protease / Kg de animal) diluídas em salina estéril foram administradas segundo metodologia 3.2.6.2. acima citada, em um volume final de 150 µL . Os controles dos experimentos foram feitos com administração de salina estéril aos animais. Após uma hora das administrações, o animal foi novamente colocado em um contensor e a medição do tempo de sangramento realizada segundo García-Manzano *et al*. (2001). Brevemente, um corte da ponta distal da cauda (1 mm da ponta da calda) foi feita, iniciando o sangramento no local, onde as gôtas de sangue eram recolhidas em uma folha de papel filtro a cada 30 segundos. O tempo entre a primeira e a última gôta, sendo essa aquela que apresenta um sinal puntiforme no papel, foi estipulado como o tempo necessário para estancamento do sangramento (tempo de sangramento). O experimento foi realizado com um n=6 animais (3 machos e 3 fêmeas) para cada grupo experimental e realizado em dois experimentos independentes. Os resultados foram expressos em tempo de sangramento (segundos) ± EPM.

**3.2.6.2.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos e hemostáticos**

Com o objetivo de analisar a variação dos parâmetros hematológicos dos animais tratados com moojenactivase-A, um segundo experimento foi realizado. A

dose de protease escolhida foi de 3 µg/Kg, que apresentou tempo de sangramento elevado e não causou letalidade dos animais. Os procedimentos de administração foram realizados como descritos segundo metodologia 3.2.6.2. acima citada. Administração de salina estéril também foi utilizada como controle da experimentação. Após 1 hora das administrações (moojenactivase ou salina), os animais foram anestesiados com solução de Cetamina e Xilazina (80 mg cetamina + 15 mg xilazina / Kg de animal) por via intra peritoneal (i.p.). Após análise dos reflexos dos animais para confirmação do estado de anestesia, uma punção cardíaca foi realizada com seringa de 5 mL com agulha 0,8 x 25 mm. Do sangue total obtido, 1 mL foi transferido para tubo contendo EDTA como anti coagulante (concentração final 1,8 mg/ mL de sangue) para a análise de hemograma completo e 4 mL foram transferidos para tubo contendo citrato de sódio (concentração final 3,2% p/v) para obteção do plasma pobre em plaquetas (PPP) e a análise dos parâmetros de hemostasia (Tempo de protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPA) e dosagem de Fibrinogênio Plasmático). O experimento foi realizado com um n=6 animais (3 machos e 3 fêmeas) para ambos os grupos administrados com a protease (3 µg/Kg) ou salina estéril, sendo realizado em dois experimentos independentes.

**Hemograma**

Uma alíquota de sangue com EDTA foi utilizada para realização do hemograma em aparelho automatizado Cell Dyn 3700 (Abbott) em modo de uso veterinário com parâmetros de análise animal “ratos”. Os parâmetros analisados foram:

- Série vermelha: contagem de eritrócitos, hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM);

- Série Branca: Número total de leucócitos, contagem diferencial de neutrófilos e mononucleares;

- Contagem de plaquetas.

**Parâmetros Hemostáticos**

**Tempo de Protrombina**

Para o Tempo de Protrombina (PT), os experimentos foram realizados utilizando plasma pobre em plaquetas (PPP) coletados em citrato de sódio 105mM obtido dos animais tratados com moojenactivase ou salina. O ensaio foi como descrito na metodologia 3.2.5.3.1. no ítem "Determinação do TP". Os resultados foram expressos pelo tempo de coagulação (segundos) ± EPM dos PPP dos animais tratados com moojenactivase ou salina.

**Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada**

Para o Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa), os experimentos foram realizados utilizando plasma pobre em plaquetas (PPP) coletados em citrato de sódio 105mM obtido dos animais tratados com moojenactivase ou salina. O ensaio foi como descrito na metodologia 3.2.5.3.1. no ítem "Determinação do TTPa". Os resultados foram expressos pelo tempo de coagulação (segundos) ± EPM dos PPP dos animais tratados com moojenactivase ou salina.

### 3.2.7 Análise estatística

A significância da diferença estatística entre os dados experimentais obtidos nos experimentos *in vitro* foi analisada pelo método de variância One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Turkey. Já para os experimentos de avaliação dos parâmetros hematológicos *in vivo* a análise estatística entre os dados experimentais obtidos foi analisada pelo método de variância One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni através do programa GraphPad Prism (versão 4 Prism, GraphPad).

# 4 RESULTADOS

## 4.1 Purificação de uma protease ativadora de protrombina a partir da peçonha de *Bothrops moojeni*

### 4.1.1 Cromatografia em Sephacryl S-200

A figura 13A ilustra o perfil cromatográfico de fracionamento dos componentes da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*, tendo como propriedade a separação pelo caráter de massa molecular das toxinas. O material coletado foi agrupado em 7 *pools* (SP-I; SP-II; SP-III; SP-IV; SP-V; SP-VI e SP-VII), sendo o conteúdo proteico avaliado por SDS-PAGE. Como ilustrado na figura 13B, observa-se que o perfil de separação apresentou uma maior eficiência principalmente entre o *pool* SP-I e o restante dos *pools*, sendo este representado majoritariamente por proteínas entre 110 – 35 kDa em condições não redutoras (Fig. 13B). Ainda, pode-se observar que no perfil eletroforético da peçonha bruta (PB), os compenentes de alta massa molecular são pouco observados (isto é, observa-se principalmente proteínas com massa molecular abaixo de 45 kDa), possivelmente devido à menor porporção dessas toxinas na composição da peçonha (Fig. 13 B).

A partir das frações obtidas da cromatografia em Sephacryl S-200, foi realizado o ensaio de atividade proteolítica sobre caseína com objetivo de avaliar a presença de metaloproteases nas frações. Como ilustrado na figura 14A, a atividade proteolítica foi observada pela peçonha bruta de *B. moojeni* (4,308± 0,381 Unidades de Atividade Proteolítica ± EPM) a qual foi inibida em cerca de 93% na presença de EDTA. Já a partir das frações cromatográficas obtidas, apenas as frações SP-I (6,0624± 2,2049 Unidades de Atividade Proteolítica), SP-II (2,9883± 1,17139 Unidades de Atividade Proteolítica ± EPM) e SP-III (5,61915± 1,30228 Unidades de Atividade Proteolítica ± EPM) apresentararm atividade proteolítica sobre a caseína. Ainda, estas frações foram inibidas em cerca de 96%, 94% e 99%, respectivamente, na presença de EDTA, indicando a presença de metaloprotease(s).

Sendo assim, as frações e a peçonha bruta, as quais apresentaram atividade sobre a caseína e foram inibidas por EDTA, foram avaliadas quanto à capacidade de ativação de protrombina pelo ensaio amidolítico sobre substrato

cromogênico (item 3.2.5.2.1.). Como ilustrado na figura 14B, observa-se que tanto a peçonha bruta (102,0 ± 1,55 U/mg ± EPM) quanto as frações SP-I (214,8 ± 11,63 U/mg ± EPM); SP-II (12,52 ± 2,12 U/mg ± EPM) e SP-III (0,53 ± 0,49 U/mg ± EPM) foram capazes de induzir a formação de trombina pela ativação da molécula de protrombina. Além disso, podemos observar que a fração SP-I, representada pela fração com proteínas de maior massa molecular, foi a fração que apresentou uma maior atividade de ativação de protrombina, quando comparados aos outros *pools* obtidos (Fig. 14B).

Levando em consideração os resultados alcançados, a fração SP-I foi escolhida para os próximos passos de purificação no intuito de isolar uma protease ativadora de protrombina. Este *pool* apresentou uma recuperação proteica de cerca de 15,7 mg de proteína a partir de um único procedimento cromatográfico de exclusão molecular. Com o objetivo de acumular uma quantidade proteica suficiente, mais um procedimento de exclusão molecular a partir da peçonha bruta de *B. moojeni* foi realizado, sendo reunido mais uma fração SP-I, a qual apresentou uma recuperação de 12,45 mg.

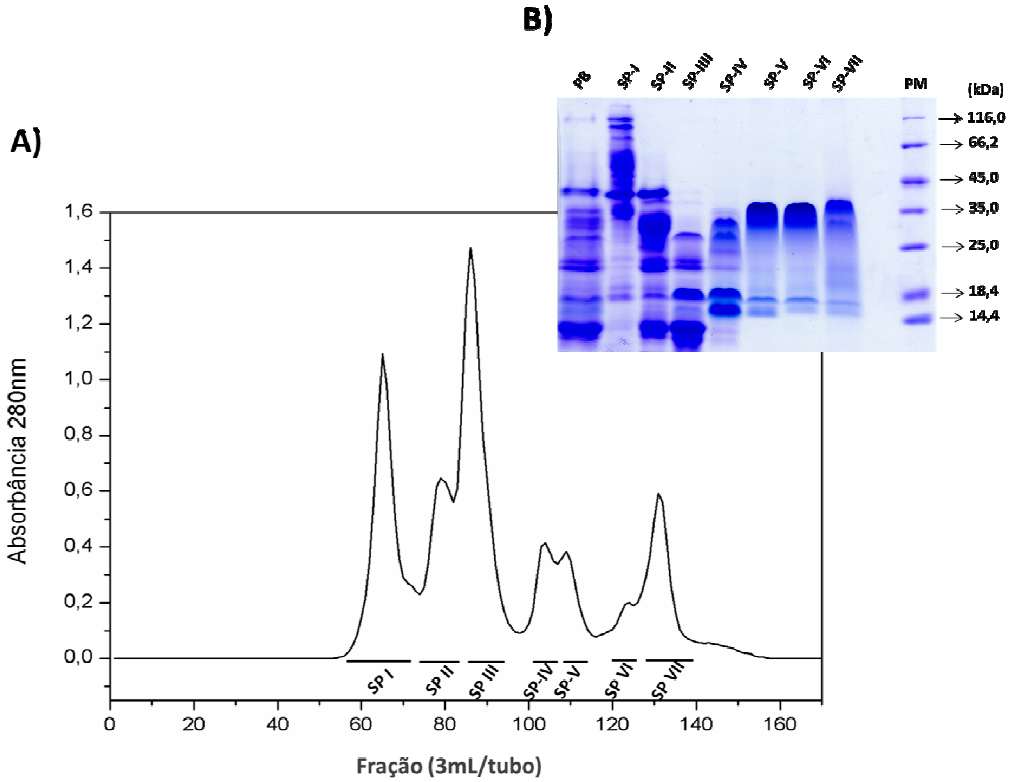



**Figura 13. Cromatografia de exclusão molecular sephacryl S-200 e análise SDS-PAGE das frações. A)** Aproximadamente 70 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foram aplicadas em coluna Sephacryl S-200 como descrito no ítem 3.2.1.1. O material eluído foi coletado em frações de 3mL/tubo de ensaio e as absorbâncias determinadas em 280 nm. As frações foram reunidas em SP-I, SP-II, SP-III, SP-IV, SP-V, SP-VI e SP-VII. **B)** Análise do conteúdo proteico das frações cromatográficas da Sephacryl S-200. No gel preparado (ítem 3.2.4.1.) foram aplicadas 20 µg das seguintes amostras: peçonha bruta de *B. moojeni* - PB; fração SP-I; fração SP-II; fração SP-III; fração SP-IV; fração SP-V; fração SP-VI; fração SP-VII; e Padrão massa molecular (PM). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra sem a presença de agentes redutores.

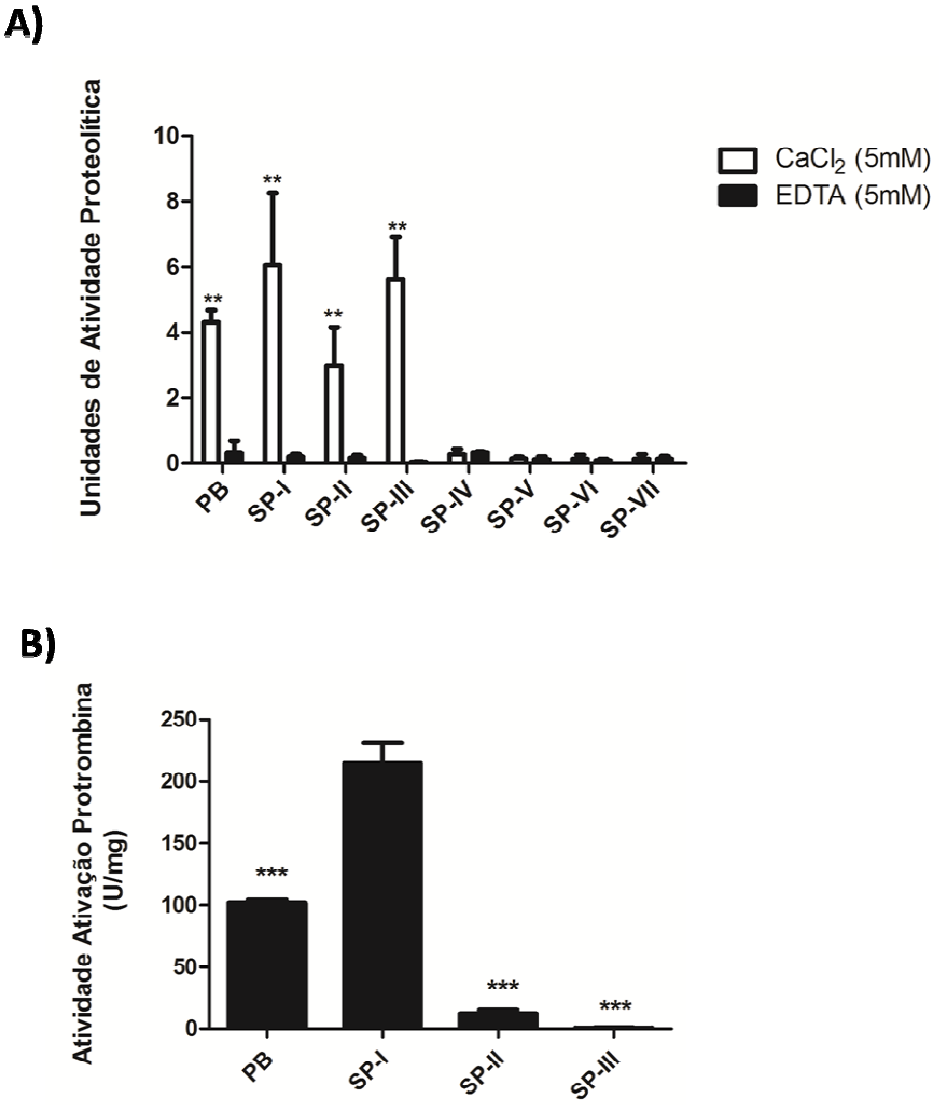



**Figura 14. Atividade Caseinolítica e Ativação de Protrombina das frações da cromatografia Sephacryl S-200.** As frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-200, além da peçonha bruta de *B.moojeni* (todas na concentração final de 0,2 mg/mL), foram testadas para atividade caseinolítica (ítem 3.2.5.1.) e atividade de ativação de protrombina (ítem 3.2.5.2.1.). **A)** Para a atividade caseinolítica, as amostras foram incubadas na presença de $CaCl_2$ ou EDTA e atividade proteolítica avaliada. O experimento foi realizado em triplicata (n=3) para cada condição e os resultados expressos pela média da Unidade de Atividade Proteolíca ± EPM. **P<0,01 quando comparado o valor de Unidade de Atividade Proteolítica entre as frações na presença de $CaCl_2$ ou EDTA. **B)** Para a atividade de ativação de protrombina, as amostras foram testadas em triplicata (n=3), sendo os resultados expressos pelo valor médio da Atividade de Ativação de Protrombina (U/mg) ± EPM. ***P<0,001 entre a fração SP-I e as outras frações SP-II e SP-II ou PB.

### 4.1.2 Cromatografia em Phenyl Sepharose

A fração SP-I (28,15 mg), obtida a partir de 2 processos cromatográficos em Sephacryl S200 (ítem 4.1.1.) e escolhida para dar continuidade no processo de isolamento, foi submetida a uma cromatografia em coluna de interação hidrofóbica. A resina Phenyl Sepharose 6 high sub é uma matriz de separação para cromatografia de interação hidofóbica, sendo a separação das moléculas baseada em suas diferenças de hidrofobicidade. Assim, as frações eluídas nesse processo cromatográfico foram reunidas em oito *pools* (PP-4M, PP-3M, PP-2,5M, PP-2M, PP-1M, PP-0,5M, PP-Tris e PP-$H_2O$) (Fig. 15A) e seu conteúdo proteico analisado por SDS-PAGE (Fig. 15B).

As frações obtidas foram inicialmente testadas para atividade proteolítica sobre caseína. Como ilustrado na Figura 16A, todas as frações apresentaram atividade proteolítica sobre a caseína, sendo essa atividade inibida na presença de EDTA em todas as 8 frações testadas (Fig. 16A), indicando a presença de metaloprotease(s) nesses *pools*.

Dessa forma, esses *pools* também foram avaliados quanto à capacidade de ativação de protrombina. De acordo com a Figura 16B, podemos perceber que todas as frações apresentaram capacidade de ativação de protrombina, sendo as frações PP-2,5M (557,0 ± 82,35 U/mg ± EPM) e PP-0,5 M (458,7 ± 126,0 U/mg ± EPM), eluidas nas concentrações de NaCl de 2,5 M e 0,5 M respectivamente, as que apresentaram maior atividade (sem diferença estatística significativa entre essas). No entanto, apesar do enriquecimento na atividade de ativação de protrombina pela fração PP-2,5M (um enriquecimento da ordem de 2 vezes quando comparada a fração SP-I do procedimento cromatográfico anterior), não foi observado o mesmo para a atividade caseinolítica.

Por apresentar uma maior tendência de formação de trombina a partir de protrombina, a fração PP-2,5M, foi escolhida para dar continuidade ao isolamento de uma protease responsável pela ativação da protrombina.

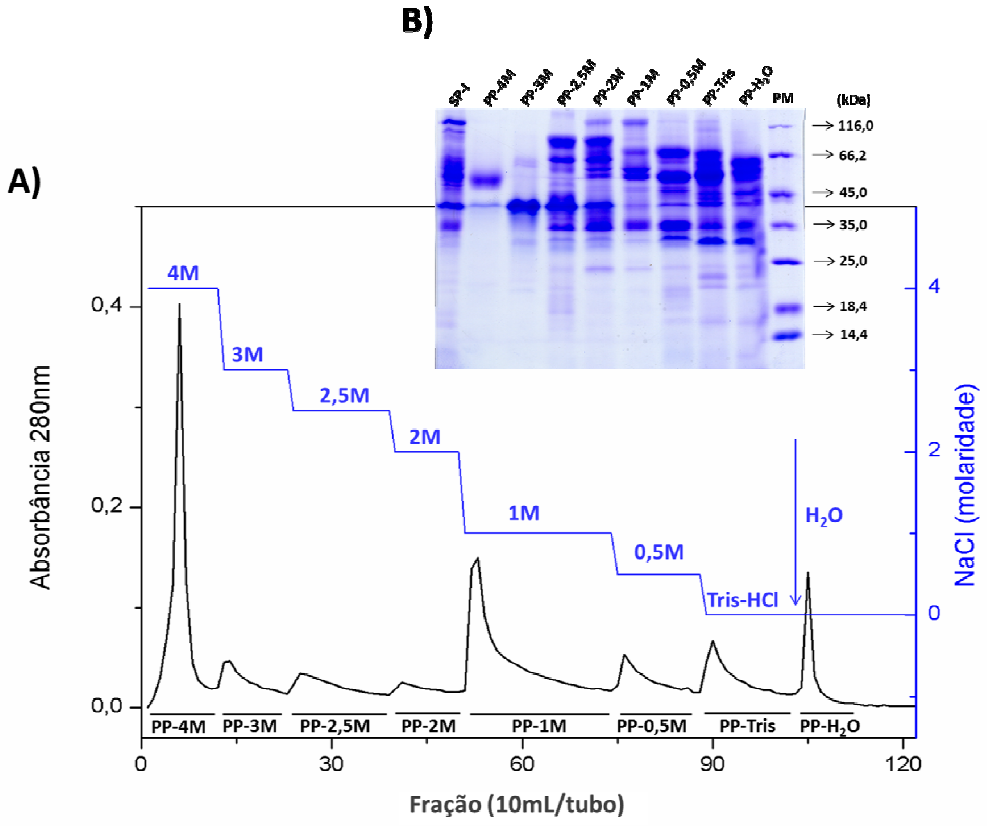



**Figura 15. Cromatografia em Phenyl Sepharose e análise SDS-PAGE das frações.**

**A)** A fração SP-I (ítem 4.1.1.) foi submetida a cromatografia de interação hidrofóbica utilizando resina Phenyl Sepharose em sistema AKTA FPLC (ítem 3.2.1.2.). A eluição do material foi feita por gradiente decrescente em *step* de tampão TRIS-HCl 10 mM pH 7,6 com concentrações de NaCl variando de 4M até ausência do sal (tampão Tris-HCl apenas), sendo que Água MiliQ última condição de eluição. O material eluído foi coletado com frações de 10mL/ tubo de ensaio. Todo o procedimento foi monitorado pela medida de absorbância a 280 nm. As frações eluídas foram reunidas em oito *pools* (PP-4M, PP-3M, PP-2,5M, PP-2M, PP-1M, PP-0,5M, PP-Tris e PP-$H_2O$). **B)** Análise do conteúdo proteico das frações cromatográficas da Phenyl sepharose. No gel preparado (ítem 4.2.4.1.) foram aplicadas 20 µg das seguintes amostras: fração SP-I; fração PP-4M; fração PP-3M; fração PP-2,5M; fração PP-2M; fração PP-1M; fração PP-0,5M; fração PP-Tris; fração PP-$H_2O$; e Padrão massa molecular (PM). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra sem a presença de agentes redutores.

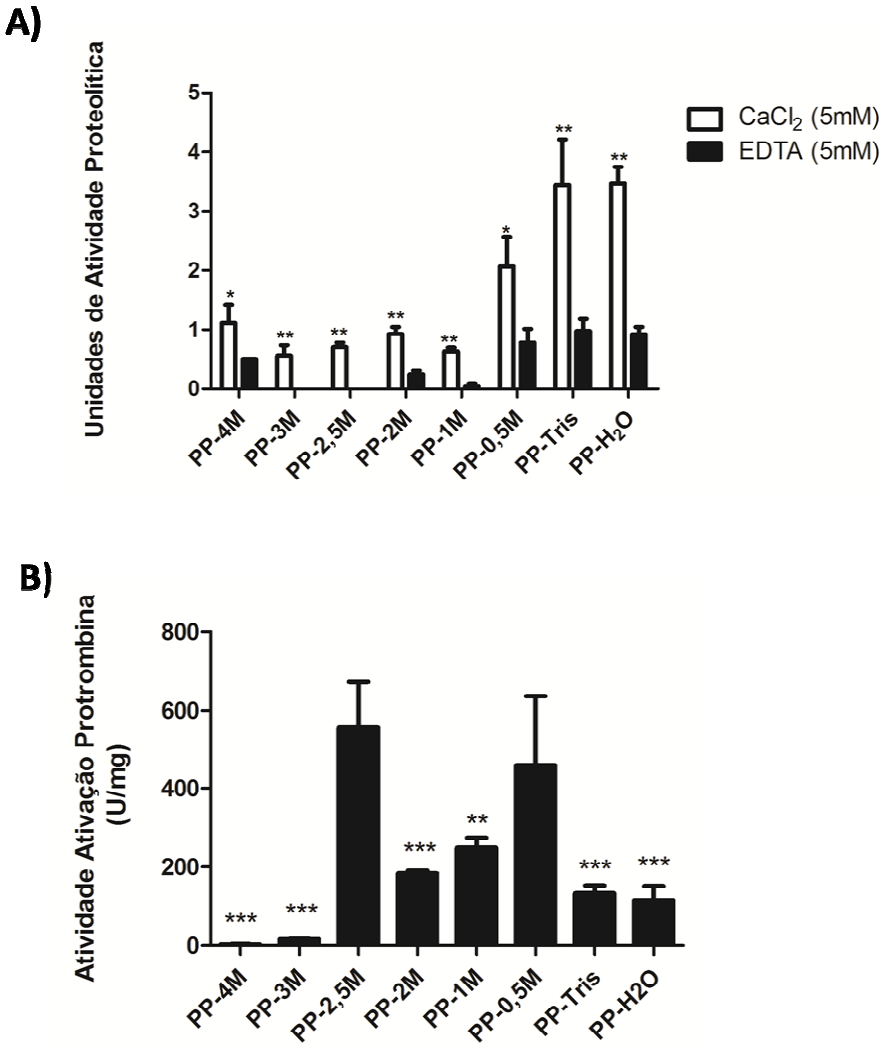



**Figura 16. Atividade caseinolítica e Ativação de Protrombina das frações da cromatografia Phenyl Sepharose.**

As frações obtidas na cromatografia de interação hidrofóbica (todas na concentração final de 0,134 mg/mL) foram testadas para atividade caseinolítica (ítem 3.2.5.1.) e atividade de ativação de protrombina (ítem 3.2.5.2.1.). **A)** Para a atividade caseinolítica, as amostras foram incubadas na presença de $CaCl_2$ ou EDTA e atividade proteolítica avaliada. O experimento foi realizado em triplicata (n=3) para cada condição e os resultados expressos pela média da Unidade de Atividade Proteolíca ± EPM. *P<0,05 e **P<0,01 quando comparado o valor de Unidade de Atividade Proteolítica entre as frações na presença de $CaCl_2$ ou EDTA. **B)** Para a atividade de ativação de protrombina, as amostras foram testadas em triplicata (n=3), sendo os resultados expressos pelo valor médio da Atividade de Ativação de Protrombina (U/mg) ± EPM. **P<0,01 e ***P<0,001 entre a fração PP-2,5M e as outras frações PP-4M, PP-3M, P-2M, PP-1M, PP-Tris e PP-$H_2O$.

### 4.1.3 Cromatografia de troca aniônica ES502 N e obtenção de uma protease ativadora de protrombina

Objetivando o isolamento de uma protease ativadora de protrombina, a fração PP-2,5M (cerca de 0,52 mg de proteína) foi submetida ao procedimento cromatográfico em coluna ES502 N de troca aniônica. A partir da análise do perfil cromatográfico, como ilustrado na Figura 17A, foi possível reunir as frações coletadas em seis *pools* nomeados EP-I, EP-II, EP-III, EP-IV, EP-V e EP-VI (Fig. 17A). A análise do conteúdo proteico das frações por SDS-PAGE está representada na Figura 17B.

As frações reunidas foram avaliadas quanto a sua capacidade proteolítica sobre a caseína onde, das seis frações testadas, apenas as frações EP-III (0,4008± 0,0106 Unidades de Atividade Proteolítica ± EPM) e EP-IV (0,545± 0,0424 Unidades de Atividade Proteolítica ± EPM) apresentaram atividade sobre o substrato e foram inibidas quando incubadas com EDTA (inibição de 87,5% e 94%, respectivamente) (Fig. 18A).

Dessa forma, ambas as frações EP-III e EP-IV foram submetidas à atividade amidolítica de ativação de protrombina, onde a fração EP-IV (153,9 ± 21,4 U/mg ± EPM) apresentou uma atividade cerca de 3 vezes maior que a fração EP-III (2.565,0 ± 15,0 U/mg ± EPM) (Fig. 18B).

A fração EP-IV apresentou um recuperação de 0,05 mg, além de apresentar um enriquecimento da atividade protrombina da ordem de 5 vezes (Tabela I). Como observado no procedimento cromatográfico anterior, a fração EP-IV também apresentou uma redução da atividade caseinolítica, mostrando que a afinidade proteolítica sobre a caseína é bastante reduzida (Tabela I), mas que essa baixa atividade proteolítica foi inibida por EDTA (Tabela I).

Dessa forma, a análise do conteúdo proteico da fração EP-IV por SDS-PAGE (Fig. 17B) e os resultados obtidos pelos ensaios de atividade caseinolítica e ativação de protrombina (18A e B), indicam que essa fração apresenta uma protease com relativo grau de homogeneidade, e com a capacidade de ativar a molécula de protrombina, gerando trombina.

Assim, a fração EP-IV, obtida pelo terceiro procedimento cromatográfico em coluna de troca aniônica ES 502N a partir da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*, foi submetida a análises quanto ao grau de pureza e características moleculares.

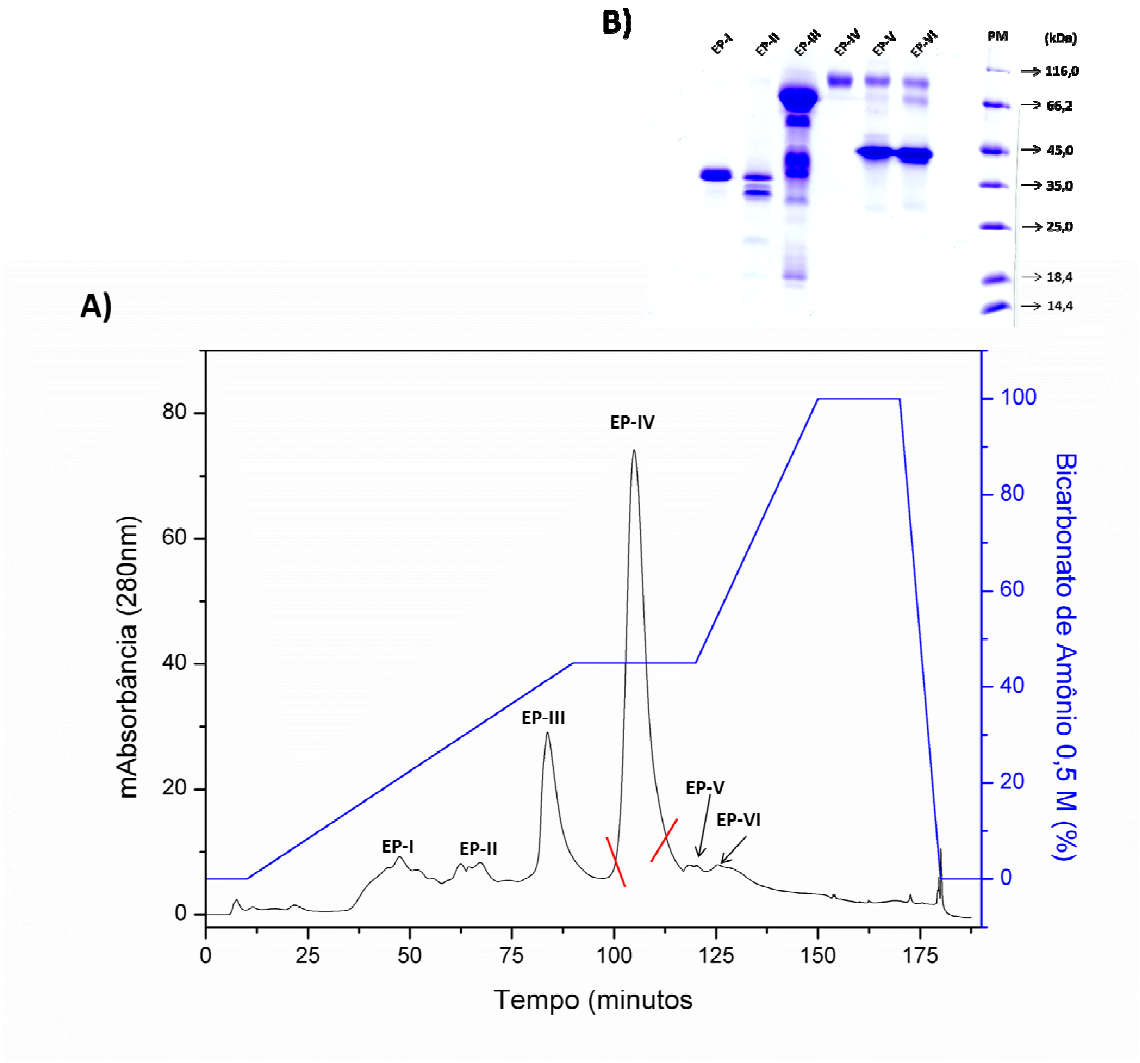



**Figura 17. Cromatografia troca anionica em coluna ES 502 N e análise SDS-PAGE das frações.**

**A)** A fração PP-2,5M, obtida no passo cromatográfico por interação hidrofóbica (ítem 4.1.2.), foi submetida à cromatografia de troca aniônica em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna ES 502 N, utilizando tampão Ambic 10 mM pH 8,0 como eluente A e Ambic 500 mM pH 8,0 como eluente B (ítem 3.2.1.3). Este procedimento teve duração total de 190 minutos com fluxo de 0,4 mL/minuto, sendo monitorado pela medida de absorbância a 280nm. As frações foram reunidas em (EP-I, EP-II, EP-III, EP-IV, EP-V e EP-VI). As linhas vermelhas correspondem o intervalo das frações as quais foram reunidas para formar o *pool* EP-IV. **B)** Análise do conteúdo proteico das frações cromatográficas da ES 502. No gel preparado (ítem 3.2.4.1.) foram aplicadas cerca de 20 µg das seguintes amostras: fração EP-I; fração EP-II; fração EP-III; fração EP-IV; fração EP-V; fração EP-VI; e Padrão massa molecular (PM). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra sem a presença de agentes redutores.

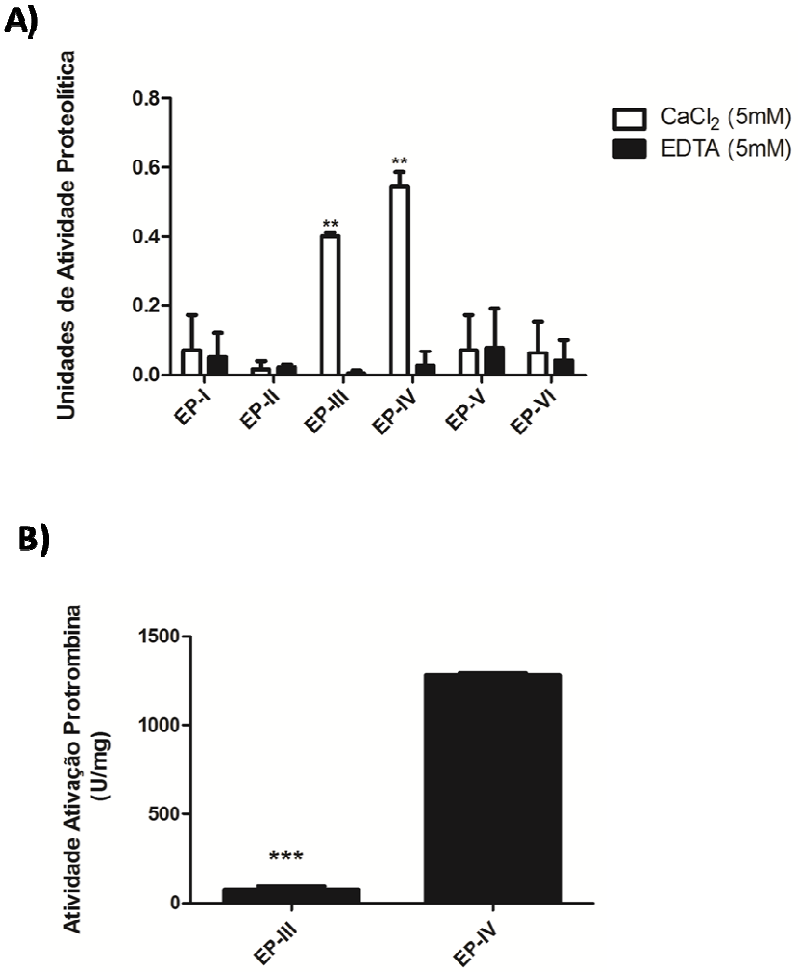



**Figura 18. Atividade caseinolítica e Ativação de Protrombina das frações da cromatografia ES-502N.** As frações obtidas na cromatografia de troca aniônica (EP-I à EP-VI - concentração final de 0,067 mg/mL) foram testadas para atividade caseinolítica (ítem 3.2.5.1.) e atividade de ativação de protrombina (ítem 3.2.5.2.1.). **A)** Para a atividade caseinolítica, as amostras foram incubadas na presença de $CaCl_2$ ou EDTA e ação proteolítica medida. O experimento foi realizado em triplicata (n=3) para cada condição e os resultados expressos pela média da Unidade de Atividade Proteolíca ± Erro Padrão Médio. **P<0,01 quando comparado o valor de Unidade de Atividade Proteolítica entre as frações na presença de $CaCl_2$ ou EDTA. **B)** Para a atividade de ativação de protrombina, as amostras foram testadas em triplicata (n=3), sendo os resultados expressos pelo valor médio da Atividade de Ativação de Protrombina (U/mg) ± EPM. ***P<0,001 entre a fração EP-III e a fração EP-IV.

**Tabela I. Análise de recuperação proteica e funcional: ES-502N fração EP-IV**

| | [b]Peçonha bruta | [c]Sephacryl S-200 (SP-I) | Phenyl Sepharose (PP-2,5M) | ES 502N (Fração EP-IV ou moojenactivase) |
|---|---|---|---|---|
| [a]Proteínas Totais (mg) | 139,79 | 28,15 | 0,52 | 0,05 |
| Proteínas Totais (%) | 100 | 20,13 | 0,37 | 0,035 |
| Unidade Atividade Proteolítica (U) | 4,3 | 3,06 | 0,7 | 0,54 |
| Unidades totais Atividade Ativação Protrombina | 14.258,5 | 6.046,6 | 289,64 | 128,25 |
| Atividade Ativação Protrombina (U/mg) | 102,0 | 214,8 | 557,0 | 2.565,0 |

[a] As concentrações de proteína foram obtidas segundo Peterson, 1983 (ítem 3.2.2.)

[b]Os valores de atividade e proteínas totais da peçonha bruta é referente ao aplicado em dois procedimentos cromatográficos diferentes.

[c] Os valores de atividade e proteínas totais da fração SP-I é referente ao material obtido de dois procedimentos cromatográficos em coluna Sephacryl S-200 diferentes.

## 4.2 Caracterização Bioquímica

### 4.2.1 Avaliação grau de pureza e análises bioquímicas da fração EP-IV

Com a finalidade de avaliar o grau de homogeneidade e obter dados sobre o caráter molecular da fração EP-IV, obtida no processo cromatográfico em coluna troca aniônica ES-502N, essa foi submetida a um processo de focalização isolelétrica e estimativa da massa molecular por SDS-PAGE, além de ser submetida a um processo de recromatografia em coluna ES-502N e cromatografia em coluna de fase reversa C-18.

Inicialmente, a fração EP-IV foi submetida novamente ao mesmo processo cromatográfico, da qual foi obtida, em coluna ES-502 com o objetivo de avaliar a eficiência desse procedimento cromatográfico e a necessidade de um novo processo de recromatografia da amostra para isolar a proteína de possíveis contaminantes. Como ilustrado na figura 19A, um pico único e homogêneo foi obtido com o mesmo tempo de retenção da fração EP-IV. Esse dado indica que um processo de recromatografia da amostra torna-se desnecessário para a essa fração.

Devido a alta capacidade de separação de moléculas, a coluna de fase reversa C-18 foi escolhida como um dos métodos de análise do grau de pureza da amostra da fração EP-IV. O cromatograma da Figura 19B mostra que a fração submetida apresentou um perfil de eluição bastante homogêneo, com um pico único de absorbância eluído com tempo de retenção de 37 minutos e em concentração de 41% do eluente B (Acetonitrila 80%). Sendo assim, os dados associados aos resultados obtidos a partir dos procedimentos cromatográficos ilustrados nas Figuras 19A e B, mostram que a fração EP-IV apresenta uma relativa homogeneidade quanto ao seu conteúdo proteico.

A fração EP-IV foi submetida a um processo de eletroforese SDS-PAGE e, como ilustrado na Figura 19C, a fração apresentou uma banda única, de relativa intensidade, com massa molecular de aproximadamente 89 kDa em condições não redutoras. Em condições redutoras (incubação prévia da amostra com β-mercaptoetanol), é possível visualizar 3 bandas distintas: a primeira com massa molecular de aproximadamente 66 kDa; uma segunda com massa molecular de aproximadamente 17 kDa; e uma terceira com massa molecular de aproximadamente 14 kDa (Fig. 19C).

A determinação do conteúdo de carboidrato da protease mostra que a proteína apresenta sitío(s) de N-glicosilação na cadeia pesada da moojenactivase, sendo o conteúdo de carboidrato com massa molecular de aproximadamente 13 kDa, correspondendo à cerca de 20 % da massa molecular da cadeia pesada (Fig. 19 D).

Já quando submetida a um procedimento de focalização isoelétrica, a fração EP-IV apresentou uma banda única corada com ponto isoelétrico (pI) calculado em 4,92, tratando-se de uma proteína de caráter ácido (Fig 19E). Esse dado corrobora com o fato dessa proteína interagir com a matriz da coluna ES-502N, composta por resíduos carregados positivamente, sendo a proteína eluída pelo aumento da força iônica aplicada pelo gradiente da solução de eluição (bicarbonato de amônia 0,5 M).

Dessa forma, os resultados obtidos pela análise molecular da fração EP-IV (Fig. 19 A - E), além dos resultados obtidos no ensaio de ativação de protrombina (Fig. 18B), mostram que a fração é composta por uma proteína N-glicosilada (conteúdo carboidrato representando cerca de 20% da massa da CP) de massa molecular de aproximadamente 89 kDa, constituída por três cadeias proteicas (CP 66 kDa, CL β 17 kDa e CL α 14 kDa) ligadas por pontes dissulfeto, e com pI de 4,92. A protease ainda apresenta capacidade de ativação da molécula de protrombina em gerar o produto ativo trombina. Sendo assim, para dar continuação aos resultados obtidos, essa metaloprotease foi denominada moojenactivase (Moojen – sulfixo derivado da espécie da serpente da qual a proteína foi isolada + activase – sulfixo utilizado para proteases capazes de ativar fatores da coagulação). Em determinadas situações, também referenciaremos à protease como MooA.

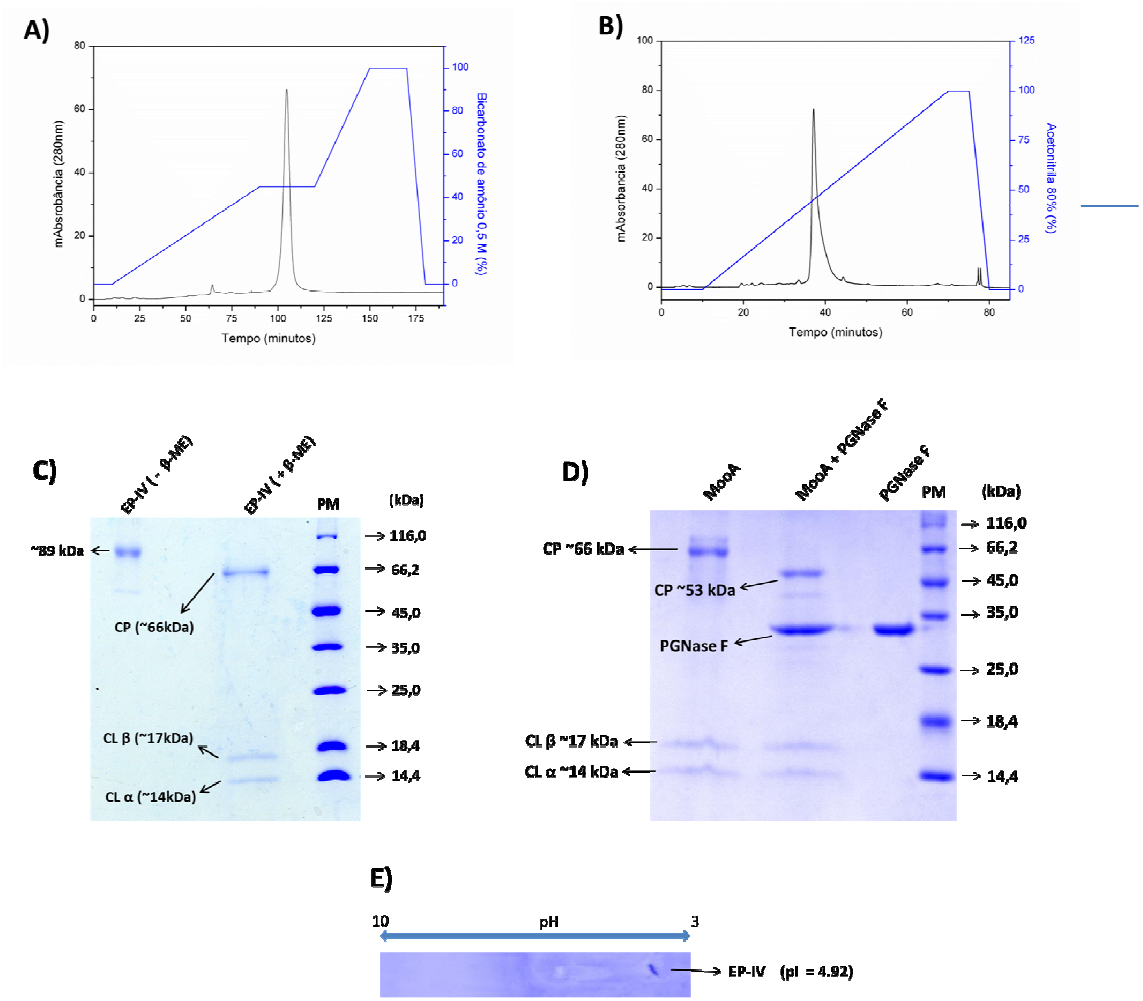



**Figura 19. Análise molecular e avaliação grau de pureza.**

**A)** Cerca de 80 µg da fração EP-IV foi submetida a um processo de recromatografia nas mesmas condições da qual a fração foi obtida em coluna de troca aniônica ES-502N (ítem 3.2.1.3.). O procedimento foi monitorado pela medida da absorbância do material eluído a 280 nm. **B)** A fração EP-IV foi submetida a uma CLAE em coluna CLC ODS C-18 (ítem 3.2.3.). O material aplicado (cerca de 75 µg) foi eluído com gradiente contínuo de solução acetonitrila 80%. O procedimento foi monitorado pela medida da absorbância do material eluído a 280 nm. **C)** No gel preparado (3.2.4.1.), foram aplicados cerca de 20 µg da fração EP-IV na ausência ( - β-ME) ou presença ( + β-ME ) de agente redutor β-mercaptoetanol. Padrão massa molecular (PM). Os indicativos de massa molecular estão indicados pelas setas, além das cadeias proteicas da qual a proteína é composta (CP – cadeia pesada; CL α – cadeia leve α; e CL β – cadeia leve β). **D)** Avaliação de glicosilação da molécular. A protease foi incubada na presença de PGNase F ou não e o conteúdo da incubação avaliado por SDS-APGE (ítem 3.2.4.4). **(E)** Determinação do ponto isoelétrico da fração EP-IV. Foram aplicados ao gel de focalização isoelétrica 25 µg da fração EP-IV, O cálculo do pI foi realizado pela determinação do pH medido de vários pontos horizontalmente do gel (de 9,7 à 3,6) comparado com o ponto de migração da banda (3.2.4.2.).

### 4.2.2 Análise da estrutura primária da moojenactivase: sequenciamento de aminoácidos dos fragmentos trípticos

A partir de amostras de moojenactivase (MooA) obtidas *in situ* pela bandas recortadas de géis de eletroforese com a protease em condições redutoras (banda cadeia pesada CP, cadeia leve α CL-α e cadeia leve β CL-β) e não redutoras (banda MooA integra com ~89 kDa) (Fig. 19C), além da proteína intacta liofilizada, foi realizado o processo de digestão por tripsina. Os peptídeos obtidos foram analisados por espectrometria MALDI ToF/ToF (ítem 3.2.4.3.2.) e ESI Q-ToF (ítem 3.2.4.3.3). Foi possível a determinação da sequência de aminoácidos de 11 peptídeos, os quais apresentavam sequências de aminoácidos e massas distintas (Tabela II).

**Tabela II. Sequência de aminoácidos obtida dos fragmentos trípticos internos da moojenactivase**

| Massa fragmento $(M + H)^+$ | Sequência aminoácidos (Peptídeo) | Origem amostra |
|---|---|---|
| 1004,54 | DDLDEIKR (1) | MooA (SDS-PAGE) / MooA liofilizada |
| 2209,09 | IYEIVNTMNEMFIPLNIR (2) | MooA (liofilizada) |
| 1095,52 | TLTSFGEWR (3) | MooA (SDS-PAGE) / MooA liofilizada |
| 1523,85 | SVAIIEDHSIISLK (4) | MooA liofilizada |
| 1905,88 | MAVIMAHEMGHNLGMKH (5) | CP (SDS-PAGE) |
| 1531,80 | HRPQCILNEPLR (6) | MooA (SDS-PAGE) / MooA liofilizada |
| 1997,14 | LTPGSQCADGLCCDQCR (7) | MooA liofilizada |
| 2756,02 | HDCDLPESCTGQSADCPMDDFQR (8) | MooA (SDS-PAGE) /CP (SDS-PAGE) |
| 1546,70 | VFNEPQNWADAEK (9) | CL-β (SDS-PAGE) / MooA liofilizada |
| 1918,03 | DCPSDWSNHEGHCYR (10) | CL-β (SDS-PAGE) / MooA liofilizada |
| 1835,83 | WVNIDCVEGNPFVCK (11) | CL-α (SDS-PAGE) |

A Figura 20 ilustra o alinhamento múltiplo de cada peptídeo obtido com outras proteases, desintegrinas-like ou lectinas-like isoladas ou com sequência de aminoácidos predictas a partir do transcriptoma do material genético da serpente. Interessantemente, observa-se uma alta identidade sequencial dos fragmentos de moojenactivase (peptídeos 1 à 8) com metaloproteases das classes PI (ex. BmooMP-alpha), PII (MP_IIx2 e MP_IIx3) e PIII (Berythractivase, Insularinase-A, HF-3, VLFXa e RVV-X) (Fig. 20). Ainda, os peptídeos 9, 10 e 11 apresentaram uma alta identidade com lectinas-like isoladas na forma livre ou associada a uma metaloprotease (isto é, aquelas metaloproteases da classe PIIId que apresentam o domínio lectina-like como a Carinactivase-1) (Fig. 20). É possível observar que as sequências de maior identidade são aquelas de origem botrópica, quando comparada a proteínas de outros gêneros (Fig. 20).

***Figura 20 (início)***

```
                                                        Identidade
MooA Peptídeo 1                 DDLDEIKR
MP_IIx2                     [28] DDLDEIKR [35]          (100%)
Berythractivase             [30] DDLDKIKR [38]          (92%)
                                 ****:***


                                                        Identidade
MooA Peptídeo 2             IYEIVNTMNEMFIPLNIR
MP_IIx3                [37] IYEIVNTMNEMFIPLNIR [54]      (100%)
Berythractivase       [227] IYEIVNTMNEMFIPLNIC [244]     (94% )
VLFXa                 [227] IYEIVNTVNEIFIPLNIR [244]     (89% )
RVV-X                 [224] IYEIVNSANEIFNPLNIH [241]     (70% )
                            ******: **:* ****


                                                        Identidade
MooA Peptídeo 3               TLTSFGEWR
Bothrojaractivase        [44] TLTSFGEWR [52]             (100%)
Insularinase-A          [266] TLTSFGEWR [274]            (100%)
RVV-X                    [77] TLNSFGEWR [85]             (89%)
AaPA                    [261] TLKSFGEWR [269]            (88%)
                              **.******


                                                        Identidade
MooA Peptídeo 4             SVAIIEDHSIISLK
MP_IIx3               [126] SVAIIEDHSIISLK [139]         (100%)
AclVMP-III            [315] SVGIIQDHSTINLM [327]         (72%)
                            **.**:*** *.*


                                                        Identidade
MooA Peptídeo 5             MAVIMAHEMGHNLGMKH
MP_IIx3               [140] MAVIMAHEMGHNLGMKH [156]      (100%)
HF3                   [329] VAVIMAHEMGHNLGINH [345]      (88%)
VLFXa                 [329] TAVIMAHELGHNLGMYH [345]      (80%)
                             *******:*****: *
```

Continuação Figura 20

```
                                                        Identidade
MooA Peptídeo 6             HRPQCILNEPLR
MP_IIx3               [197] HRPQCILNEPLR [208]          (100%)
Batroxstatin-3        [195] HTPQCILNEPLR [206]          (92%)
BmooMPalpha-I         [195] HNPQCILNEPL- [205]          (91%)
Bothropasin           [385] ENPQCILNEPLG [395]          (78%)
                            . *********

                                                        Identidade
MooA Peptídeo 7             LTPGSQCADGLCCDQCR
Jerdonitin            [434] LTPGSQCADGLCCDQCR [450]     (100%)
Desintegrina Acp       [11] LTPGSQCAEGLCCDQCK [26]      (90%)
Berythractivase       [438]LTPGSQCVEGLCCDQCR [454]      (88%)
                            *******.:*******

                                                        Identidade
MooA Peptídeo 8         HDCDLPESCTGQSADCPMDDFQR
Berythractivase   [467] HDCDLPESCTGQSADCPMDDFQR [489]   (100%)
AplVMP-III        [467] SECDIAESCTGQSAECPTDDFQR [489]   (72%)
HF3               [466] SECDIAESCTGQSAECPTDDFQR [488]   (72%)
                         :**:.********:** *****

                                                        Identidade
MooA Peptídeo 9                 VFNEPQNWADAEK
Alboagregina-A Sub. β      [16] VFNEPQNWADAEK [28]      (100%)
Fator IX/X Bp              [16] VFTEPQNXADAEK [28]      (85%)
Carinactivase-1  CL α      [16] VFDEPKKWADAEK [28]      (77%)
                                ** **:: *****

                                                        Identidade
MooA Peptídeo 10              DCPSDWSNHEGHCYR
Bothroalternin            [1] DCPSDWSNHEGHCYR [15]      (100%)
Alboagregina-A  Sub. β    [1] DCPSDWSSYEGHCYR [15]      (87%)
Carinactivase-1 CL β      [1] DCLPGWSSHEGHCYK [15]      (70%)
                              ** ..**.:*****:
```

Continuação Figura 20

```
                                                    Identidade
MooA Peptídeo 11              WVNIDCVEGNPFVCK
GPIb-BP                 [123] WVNIDCVEGNPFVCK [137]      (100%)
Alboagregina-A Sub. α   [116] WINLGCIQLNPFVCK [130]      (60%)
                              *:*:.*:: ******
```

**Figura 20. Alinhamento múltiplo dos peptídeos trípticos da moojenactivase**

A análise de identidade dos resíduos de aminoácidos entre os peptídeos trípticos da moojenactivase (MooA) com outras proteases, desintegrinas-like e lectinas-like de serpentes foram obtidas através dos bancos dos programas BLAST e FASTA. O alinhamento multiplo foi realizada utilizando programa Clustal X (versão 2.02). Os epaçamentos (ou *Gaps*) estão indicados por "-" enquanto que "*" indica o posicionamento que apresenta um único e completo resíduo conservado. O sinal ":" indica que grupos de aminoácidos relacionados estão fortemente conservados e o sinal "." Indica que grupos de aminoácidos relacionados estão fracamente conservados. Os números entre colchetes [ ] representam o intervalo dos resíduos na respectiva molécula integra. As porcentagens representam a identidade entre os resíduos de aminoácidos das proteínas em alinhamento. Dentre as toxinas selecionadas para o alinhamento, foram citadas: RVV-X cadeia (*Daboia russelli* – GI 251204), Carinactivase-1 Cadeia Leve CL α (GI 82116407) e cadeia leve β (GI 82116409) (*Echis carinatus*), VLFXa (*Vipera Lebetina* – GI 73621852), Alboagregina A cadeia α (GI - 3023230) e cadeia β (GI 3023232 - *Trimeresurus albolabris*), BmooMPalpha-I (*Bothrops moojeni* – GI 229462813), Berythractivase (*Bothrops erythromelas* – GI 82216043), HF3 (*Bothrops jararaca* – GI 82219706), MP_IIx3 (*Bothrops neuwiedi* – GI 308212514), MP_IIx2 (*Bothrops neuwiedi* – GI 308212512), AclVMP-III (*Agkistrodon contortrix laticinctus* – GI 258618056), Bothrojaractivase (*Bothrops jararaca* – GI 187655925), Insularinase A (*Bothrops insularis* – GI 82197476), AaPA (*Agkistrodon acutus* – GI 123910289), Jerdonitin (*Protobothrops jerdonii* – GI 48427991), Batroxstatin (*Bothrops atrox* – GI 39545516), Bothropasin (*Bothrops jararaca* – GI 209870468), Desintegrina Acp (*Agkistrodon Contortrix pictigaster* – GI 73486809), AplVMP-III (*Agkistrodon piscivorus leucostoma* – GI 332321850), Factor IX/X-Bp (*Bothrops jararaca* – GI 510120735), Bothroalternin (*Bothrops alternatus* – GI 215275207), GPIb-BP (*Bothrops jararaca* – GI 82116886).

Um segundo alinhamento dos fragmentos trípticos foi realizado, agora comparando com a sequência completa de três metaloproteases da classe PIII isoladas da peçonha de serpentes do gênero Bothrops (Berytractivase - *Bothrops erythromelas*; HF-3 - *Bothrops jararaca*; e Bothropasin - *Bothrops jararaca*) e uma lectina-like (Alboagregina A) isolada da peçonha da serpente *Trimeresurus albolabris*. Inicialmente, os resultados ilustrados na figura 21A mostram que grande parte dos peptídeos moojenactivase (peptídeos 1 a 6) apresentam alta similaridade com segmentos que pertencem ao domínio metaloprotease das proteases relacionadas. Ainda, o peptídeo 5 (MAVIMAHEMGHNLGMKH) apresenta a sequência comum ao domínio catalítico metaloprotease (HEXXHXXGXXH), composto pela tríade de Histidina e um resíduo de glicina (Fig. 21A).

Os fragmento 7 e 8 apresentaram alinhamento aos segmentos peptídicos referentes a região do domínio Desintegrina-like das proteases alinhadas (Fig. 21B). Como ilustrado na figura 21, o peptídeo 8 (HDCDLPESCTGQSADCPMDDFQR) apresentou os resíduos DCD em substituição à região RGD, região essa que apresenta a tríade de amino ácido Arginina, Glicina, Aspartato e está envolvida nas funções biológicas dessa classe. Essa modificação também é observada para as outras proteases alinhadas como a Berythractivase (DCD), Bothropasin (ECD) e HF3 (ECD).

Os peptídeos 9, 10 e 11 apresentaram uma alta similaridade sequencial à lectina-like Alboagregina A (Fig. 21D). Esses fragmentos foram encontrados não apenas pela digestão por tripsina da banda integra de moojenactivase (banda ~89 kDa), mas também nos fragmentos analisados das bandas referentes à Cadeia Leve β (sequencia peptídeos 9 e 10) e a Cadeia Leve α (peptídeo 11), confirmando assim a posição dos fragmentos quanto à posição das cadeias α e β (Fig. 21D).

Não foi possível obter fragmento(s) trípticos da moojenactivase com sequencia alinhada ao domínio rico em cisteína (Fig. 21). Todos os resíduos de cisteína, em todos os peptídeos e domínios alinhados, apresentam-se conservados (Fig. 21).

Os resultados obtidos pela análise das sequências dos digestos trípticos confirmam a presença dos domínios metaloprotease, desintegrina-like e lectina-like na molécula de moojenactivase. Apesar de não ter sido obtido fragmentos do domínio rico em cisteína, os dados apresentados atestam a hipótese da moojenactivase fazer parte da classe PIIId de metaloproteases.

## *Figura 21 (início)*

**A) Domínio Metaloprotease**

```
                    1                                                                   70
Moojenactivase      ------------------------------DDLDEIKR-IYEIVNTMNEMFIPLNIR-------------
Berythractivase     LTPEQQAYLDAKKYVEFVVVLDHGMYKKYKDDLDKIKRRIYEIVNTMNEMFIPLNICVALTGLEIWSKGD
HF3                 VTAEQQRYN-HYKYIELVILADYRMVTKNNGDLGKIRTKIYEIVNILNEIFRYLYIRIALVGIEIWSNAD
Bothropasin         VTAEQQKYN-PFRYVELFIVVDQGMVTKNNGDLDKIKARMYELANIVNEILRYLYMHAALVGLEIWSNGD
                                                  **  *    **  *  **    *

                    71                                                                 140
Moojenactivase       ----------TLTSFGEWR--------------------------------------SVAIIEDHSII
Berythractivase      KINVTSESWFTLILFTNWRGADLLKRKSHDNAQLLTNTDFDGSTIGRAHIGSMCHPYLSVGIIQDYSPV
HF3                  LSNVTLSADDTLASFGTWRGTVLLKRKSHDNAQLLTAIDFDGQTIGIANIASMCNQNKSVGVVMDYSPI
Bothropasin          KITVKPDVDYTLNSFAEWRKTDLLTRKKHDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSMCHPKRSVAIVEDYSPI
                               **  *  **                                          **      *

                   141                                                                  212
Moojenactivase      SLKMAVIMAHEMGHNLGMKH---------------------------------------HRPQCILNEPLR
Berythractivase     NLLVASTMAHEMGHNLGMHHDNDTCTCGAPSCVMAAAISKDPSKLFSNCSQEYQRKYLIKNRPQCLLNKPLR
HF3                 NLVVAVIMAHEMGHNLGINHDTGSCSCGGYSCIMAPEISDQPSKLFSNCSKQAYQRYINYYKPQCILNEPLR
Bothropasin         NLVVAVIMAHEMGHNLGIHHDTDFCSCGDYPCIMGPTISNEPSKFFSNCSYIQCWDFIMKENPQCILNEPLG
                     *  *  **********  *                                        ****** **
```

**B) Domínio Desintegrina-Like**

```
                   213                                                   268
Moojenactivase      --------------------------------------LTPGSQCADGLCCDQCR
Berythractivase     TDIISPPVCGNELLEVGEECDCGTPENCRDPCCNATTCKLTPGSQCVEGLCCDQCR
HF3                 TDIVSPPVCGNELLEMGEECDCGSPRNCRDPCCDAATCKLHSWVECESGECCDQCR
Bothropasin         TDIVSPPVCGNELLEVGEECDCGTPENCQNECCDAATCKLKSGSQCGHGDCCEQCK
                                                          *     *  * ** **

                   269                                          314
Moojenactivase      ------------HDCDLPESCTGQSADCPMDDFQR-----------
Berythractivase     FRKTGTECRAAKHDCDLPESCTGQSADCPMDDFQRNGHPCQNNNGY
HF3                 FKGAGTECRAARSECDIAESCTGQSADCPTDDFKRNGQPCLHNYGY
Bothropasin         FSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFHKNGQPCLDNYGY
                                  **  * *****  ** * *
```

**C) Domínio Rico em Cisteina**

```
                   315                                                   370
Moojenactivase      -------------------------------------------------------
Berythractivase     CYNGKCPTMENQCIDLVGPKATVAEDSCFKDNQKGNDYGYCRKENGKKIPCEPQDV
HF3                 CYNGNCPIMYHQCYALFGSNATVAEDGCFEFNENGDKYFYCRKQSGVNIPCAQEDV
Bothropasin         CYNGNCPIMYHQCYALFGADVYEAEDSCFKDNQKGNYYGYCRKENGKKIPCAPEDV

                   371                                                   426
Moojenactivase      -------------------------------------------------------
Berythractivase     KCGRLYCNDNSPGQNNPCKCIYFPRNEDRGMVLPGTKCADGKVC-SNRHCVDVATAY
HF3                 KCGRLFCHTK----KHPCDYKYSE-DPDYGMVDNGTKCADGKVC-SNGHCVDVATAY
Bothropasin         KCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNDDEHKGMVLPGTKCADGKVC-SNGHCVDVATAY
```

Continuação Figura 21

**D) Domínio Lectin-Like**

**Cadeia β**

```
                    1                                                   60
Moojenactivase      DCPSDWSNHEGHCYRVFNEPQNWADAEK--------------------------------
Alboagregina A      DCPSDWSSYEGHCYRVFNEPQNWADAEKFCTQQHKGSHLVSFQSSEEADFVVQMTRPILN
                    *******  *******************

                   61                                                      123
Moojenactivase      ------------------------------------------------------------
Alboagregina A      ANLVWIGLSNLWNQCNSQWSDGTXLDYKXWREQFECLVSRTTNNEWLSMDCSSTHSFVCEFQA
```

**Cadeia α**

```
                   1                                                        70
Moojenactivase     ----------------------------------------------------------------------
Alboagregina A     DFHCLPGWSAYDQYCYRVFNEPKNWEDAERFCAKQADSGHLVSIETMGEADFVAQLISENIQSEKHYVWI

                  71                                                      134
Moojenactivase     ---------------------------------------------WVNIDCVEGNPFVCK----
Alboagregina A     GLKVQNKEQQCSSEWSDGSSVTYENLIKLYMRKCGALEQESGFRKWINLGCIQLNPFVCKFPPQ
                                                                 * *  *   ******
```

**Figura 21. Alinhamento múltiplo fragmentos moojenactivase x sequênciancias completas**

Alinhamento dos peptídeos moojenactivase com outras metaloproteases e lectina-like de serpentes foi realizada utilizando programa Clustal X (versão 2.02). Os epaçamentos (ou *Gaps*) estão indicados por "-" enquanto que "*" indica o posicionamento que apresenta um único e completo resíduo conservado. Os resíduos de cisteína estão destacados em negrito. Os números acima do início e do fim de cada peptídeo representa o intervalo dos resíduos na respectiva molécula integral. O alinhamento foi dividido pelos domínios ( A) Metaloprotease, B) Desintegrina-like, C) Rico em Cisteína e D) Lectina-Like) presentes nas moléculas de metaloprotease da classe PIIId. No domínio metaloprotease, foi destacado em vermelho o sítio catalítico (HEXXHXXGXXH). No domínio Desintegrina-like foi destacado em azul. Metaloproteases: Berythractivase (*Bothrops erythromelas*), HF3 (*Bothrops jararaca*) e Bothropasin (*Bothrops jararaca*); Lectina-like: Alboagregina A (*Trimeresurus albolabris*). As sequências foram obtidas a partir do banco de dados utilizando o programa BLAST.

## 4.3 Avaliação funcional *in vitro*

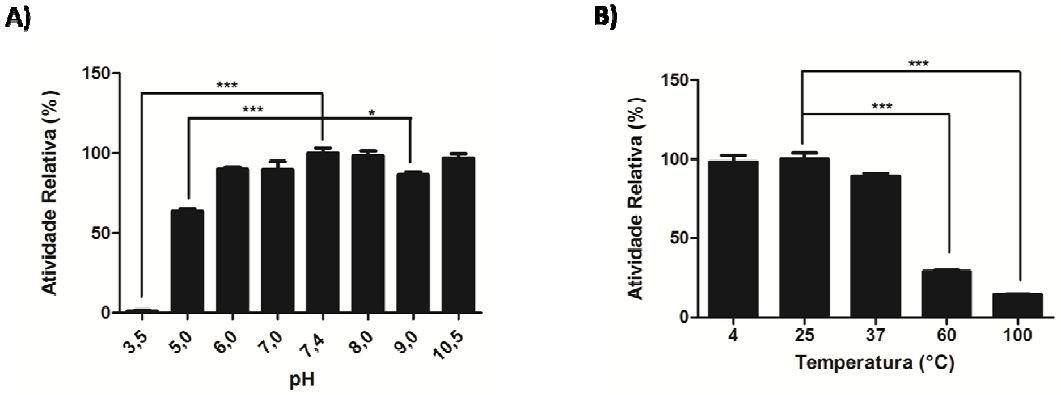
### 4.3.1 Análise de estabilidade e efeito de íons e inibidores na capacidade de ativação de protrombina

Com a finalidade de verificar a estabilidade da protease no processo funcional de ativação de protrombina *in vitro*, ensaios foram realizados nos quais a moojenactivase foi submetida a diferentes condições físico-químicas e biológicas.

#### 4.3.1.1 Estabilidade

Inicialmente, a protease foi incubada em diferentes condições de pH e temperatura e a atividade de ativação de protrombina avaliada pelo método de atividade amidolítica (ítem 3.2.5.2.1.). Como ilustrado na Figura 22 A, a atividade de ativação de protrombina pela moojenactivase foi anulada pela incubação prévia da protease em pH 3,5 (cerca de 99% de inibição), e mantendo-se reduzida quando incubada em pH 5,0 (63% atividade relativa) quando comparada a atividade em condição de pH 7,4. A incubação prévia entre pH 6,0 à 8,0, apresentou variação da capacidade funcional da protease. Já em pH 9,0, foi observada uma pequena redução da atividade (cerca de 14% de redução), porém não sendo mantida pela incubação em pH 10,5 a qual manteve-se sem variação quando comparada a condição de pH 7,4 (Fig. 22A).

No experimento onde a temperatura de incubação prévia foi avaliada (Fig. 22B), pode-se observar uma redução de 72% e 85% da ativação de protrombina quando a protease foi previamente submetida a 60ºC e 100º C. Esses valores foram comparados a atividade da toxina previamente incubada a 25ºC. Porém, incubação prévia às temperaturas de 4, 25 e 37 ºC não foi eficaz de induzir variação na capacidade funcional (Fig. 22B).




F

**Figura 22. Estabilidade pH e temperatura sobre a ativação de protrombina pela moojenactivase-A**

Moojenactivase foi submetida a incubação em diferentes condições de pH (A) e temperatura (B) por 30 minutos a 37ºC e em seguida uma alíquota submetida a atividade amidolítica de ativação de protrombina, (ítem 3.2.5.2.1). O experimento foi realizado em triplicata (n=3) para cada condição testada, sendo os resultados expressos pela atividade relativa (%) ± EPM da atividade protrombina. As condição em pH 7,4 (**A**) e 25ºC (**B**) foram baseadas como controle e consideradas 100%. ***P<0,001 e *P<0,1, quando comparadas aos valores de referência.

#### 4.3.1.2 Efeito de íons

A avaliação do efeito de íons e inibidores na capacidade de ativação de protrombina foi realizada pela incubação prévia da moojenactivase na presença de diferentes sais de íons divalentes ou inibidores.

Como ilustrado na Figura 23A, a incubação prévia da moojenactivase em solução de $CuCl_2$ a 5 mM foi capaz de promover uma redução da ativação de protrombina em cerca de 50% (Fig. 23A). Porém, nas demais condições de sais iônicos avalidas, não foi possível observar nenhuma alteração da ativação de protrombina, quando comparada ao controle (Fig. 23A).

Dada a importância dos íons cálcio para a atividade funcional de algumas metaloproteases de peçonhas de serpentes, concentrações intermediárias à aquelas testadas foram avalidas. Como mostra a Figura 23B, a incubação em solução $CaCl_2$ de 1 e 10 mM não foi capaz de induzir uma alteração na atividade da protease.

Ainda, a partir da observação dos resultados ilustrados na Figura 23A, onde as incubações prévias com $MgCl_2$ e $MnCl_2$ apresentaram uma tendência de diminuição da ativação de protrombina pela protease (porém sem apresetarem um valor estatisticamente reduzido quando comparado ao controle), um segundo experimento foi realizado com concentrações de 1 e 10 mM para cada sal iônico, onde foi observado (Fig. 23C e D) que ambas as condições de sais e concentração não foram capazes de alterar a resposta da moojenactivase.

Dessa forma, os resultados obtidos mostram que o íons $Cu^{2+}$ foram capazes de reduzir a atividade funcional de ativação de protrombina, porém não sendo observado para outros íons, como íons cálcio, indicando que a protease não é dependente desse íon para sua função enzimática.

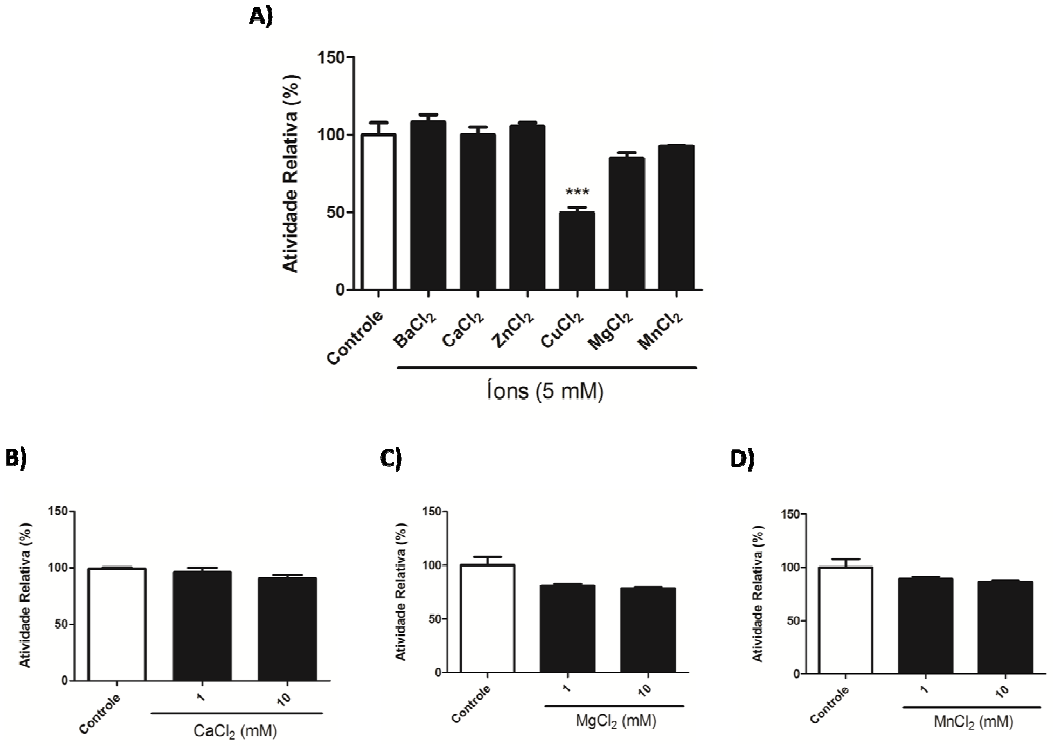



**Figura 23. Avaliação do efeito de íons na atividade da moojenactivase-A sobre a ativação de protrombina**

**(A)** Moojenactivase foi previamente submetida à incubação em diferentes soluções com sais de íons divalentes e submetida a atividade amidolítica de ativação de protrombina (ítem 3.2.5.2.1). Para os sais $CaCl_2$ **(B)**, $MgCl_2$ **(C)** e $MnCl_2$ **(D)**, foram avaliadas diferentes concentrações ionicas. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) para cada condição testada, sendo os resultados expressos pela atividade relativa de atividade de ativação de protrombina (%) ± EPM da atividade protrombina. Controle representa a incubação da protease na ausência de íons considerando atividade relativa de 100%. ***P<0,001 e *P<0,1 quando comparado ao controle.

### 4.3.1.3 Efeito de inibidores

A avaliação da capacidade de modulação da atividade funcional da moojenactivase por diferentes inibidores e moléculas biologicamente ativas, foi avaliada. Como apresentado na Figura 24, a incubação prévia da protease na presença de EDTA (5mM), SDS (10 mM), Soro anti-ofídico (1:20 m/m) ou DTT (10 mM) foi capaz de reduzir a atividade em 93, 100, 55 e 97%, respectivamente. Os demais inibidores testados (Benzamidina a 20 mM, citrato de sódio a 13,6 mM, E-64 a 10 µM, Fosforamidon a 40 µM, e $\alpha_2$-macroglobulina (1:2 razão molar)) não foram capazes de alterar a atividade da moojenactivase (Fig. 24).

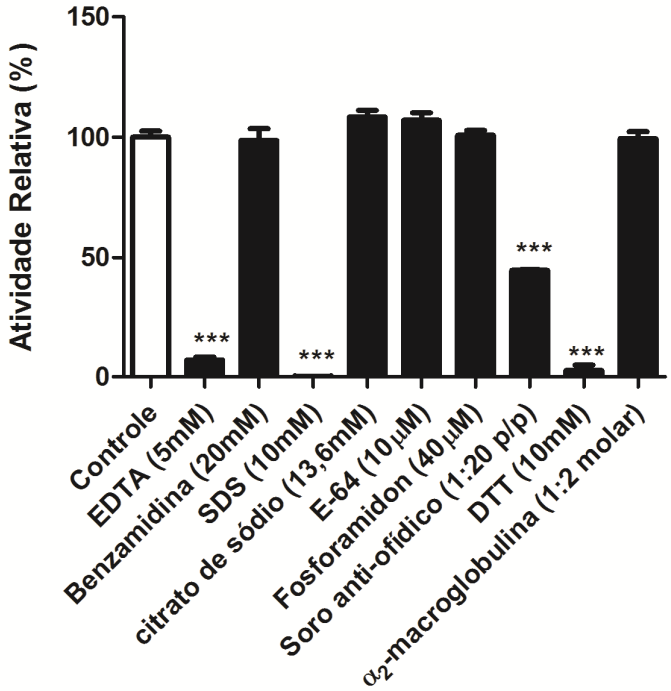



**Figura 24. Avaliação do efeito de inibidores na atividade da moojenactivase-A sobre a ativação de protrombina**

Moojenactivase foi submetida a incubação prévia na presença de diferentes inibidores e submetida a atividade amidolítica de ativação de protrombina (ítem 3.2.5.2.1). O experimento foi realizado em triplicata (n=3) para cada condição testada, sendo os resultados expressos pela atividade relativa (%) ± EPM da atividade protrombina. Controle representa a incubação da protease na ausência de inibidores considerando atividade relativa de 100%. ***P<0,001 e *P<0,1 quando comparado ao controle.

### 4.3.2 Avaliação da atividade sobre fatores envolvidos na hemostasia: Ativação de fatores da coagulação, análise molecular dos produtos e avaliação enzimática

#### 4.3.2.1 Atividade Amidolítica de Ativação de zimogênios da cascata de coagulação

Tendo-se o conhecimento da capacidade de ativação da molécula de protrombina pela moojenactivase, a eficiência da protease em induzir a formação de um produto ativo a partir da ativação de outros fatores de coagulação que participam do processo de hemostasia também foi avaliada. O ensaio consistiu na medida da Atividade de Ativação de Protrombina, Fator X, Plasminogênio e Proteína C na presença do substrato cromogênico específico para os produtos da ativação dos zimogênios (S-2238, S-2222, S-2251 e S-2366, respectivamente), pelo ensaio de Atividade Amidolítica (ítem 3.2.5.2.1.). Os resultados ilustrados na Tabela III mostram que a moojenactivase, além da capacidade de ativação da protrombina já evidenciada (2.452,0 ± 83,68 U/mg), foi capaz também de induzir a ativação do Fator X da cascata de coagulação (13.66,0 ± 358,2 U/mg), apresentando uma eficiência enzimática da ordem de 5 vezes quando comparada a Protrombina (Tabela III). No entanto, para os zimogênios Plasminogênio e Proteína C, moojenactivase apresentou valores de atividade específica sem significancia (5,5 ± 2,7 U/mg e 7,47 ± 1,9 U/mg, respectivamente) (Tabela III).

**Tabela III. Ativação zimogênios que participam da coagulação**

| Zimogênio | [a]Atividade de Ativação (U/mg) |
|---|---|
| Protrombina | 2.452,0 ± 83,68 |
| Fator X | 13.661,0 ± 358,2 |
| Plasminogênio | 5,5 ± 2,7 |
| Proteína C | 7,47 ± 1,9 |

[a] O experimento foi realizado pela técnica de atividade amidolítica (ítem 3.2.5.2.1.) em triplicata (n=3) para cada zimogênio testado, sendo os resultados calculados e expressos pela média da Atividade de Ativação ± EPM (U/mg).

**4.3.2.2 Efeito da capacidade de ativação de Protrombina e Fator X: análise dos produtos de proteólise formados e determinação da atividade específica**

A paritr dos resultados obtidos no ítem anterior (4.1.5.2.1.), referentes a capacidade de ativação dos fatores de coagulação Protrombina e Fator X, avaliamos o perfil enzimático e proteolítico da ativação desses fatores pela moojenactivase.

O reagente contendo protrombina humana (Calbiochem) apresenta em sua composição a molécula de protrombina intacta, assim como um produto inativo: a Pré-trombina/des F1 (as respectivas bandas estão indicadas na figura 25A). A clivagem entre resíduos de aminoácidos específicos de ambos os componentes, podem levar a formação da molécula de trombina. Inicialmente, a partir do perfil eletroforético dos fragmentos proteolíticos gerados pela incubação da moojenactivase com a Protrombina, ilustrado na Figura 25A, podemos observar o consumo inicial da banda referente a Protrombina íntegra (banda Protrombina – Fig. 25A) e gradual formação de um produto de aproximadamente 35 – 36 kDa referente a Trombina, a partir de 10 minutos do início da incubação. O consumo majoritário do substrato protrombina e Pré-trombina/des F1, e a consequente intensificação da banda referente à Trombina, ocorreu após 45 minutos de incubação (Fig. 25A). Ainda, também é possível notar que a partir do consumo da banda referente à Protrombina, não é possível detectar paralelamente o consumo da banda referente à Pré-trombina 1/des F1 (Fig. 25A), sendo essa banda somente ativada após a degradação da banda de Protrombina. Esses dados indicam que a moojenactivase apresenta uma possível preferencia de ação enzimática sobre a molécula de Protrombina intacta quando comparada a Pré-trombina/des F1, mas sendo capaz de gerar a formação de trombina a partir de ambos os componentes.

Com o objetivo de identificar o principal produto de degradação da Protrombina, um fragmento da banda referente ao produto com aproximadamente 36 kDa (Fig. 25A), obtido pela eletrotransferência do material em SDS-PAGE para uma membrana de PVDF (ítem 3.2.5.2.3.), foi submetida a análise de sequência N-terminal de aminoácidos (ítem 3.2.5.2.3.) onde foi obtida uma sequência de 17 resíduos, o qual a análise do alinhamento entre esse fragmento indicou 100% de identidade com a sequencia N-terminal da cadeia B da α-trombina e com a molécula de protrombina a partir do resíduo Isoleucina 321. Esses dados indicam não apenas a confirmação da formação do produto ativo α-trombina, como também a capacidade

da moojenactivase em clivar a molécula de Protrombina entre os resíduos $Arg^{320}$-$Ile^{321}$ (Fig. 25B).

Ainda, com a finalidade de uma analise quantitativa mais específica sobre a formação de trombina a partir da Protrombina, o produto da incubação moojenactivase/substrato foi quantificado pela relação de formação da trombina humana ativa com uma curva controle obtida a partir da atividade amidolítica da trombina isolada (Sigma – Fig. 25D), como descrito no ítem 3.2.5.2.1.2. Os resultados obtidos, e ilustrados na Figura 25C, mostram que a formação máxima da trombina (e consequentemente o consumo do substrato) ocorre aproximadamente após 45 minutos de incubação (26,29 nM ± 0,66 nM Trombina), e mantendo com valores aproximados até 90 minutos (27,22 nM ± 0,32 nM Trombina - Fig. 25C). Ainda, a partir dos valores obtidos da formação de trombina, foi calculada uma Atividade Específica para a Protrombina de 22,56 nmols trombina. $min^{-1}.mg^{-1}$ após 5 minutos de incubação (Fig. 25C).

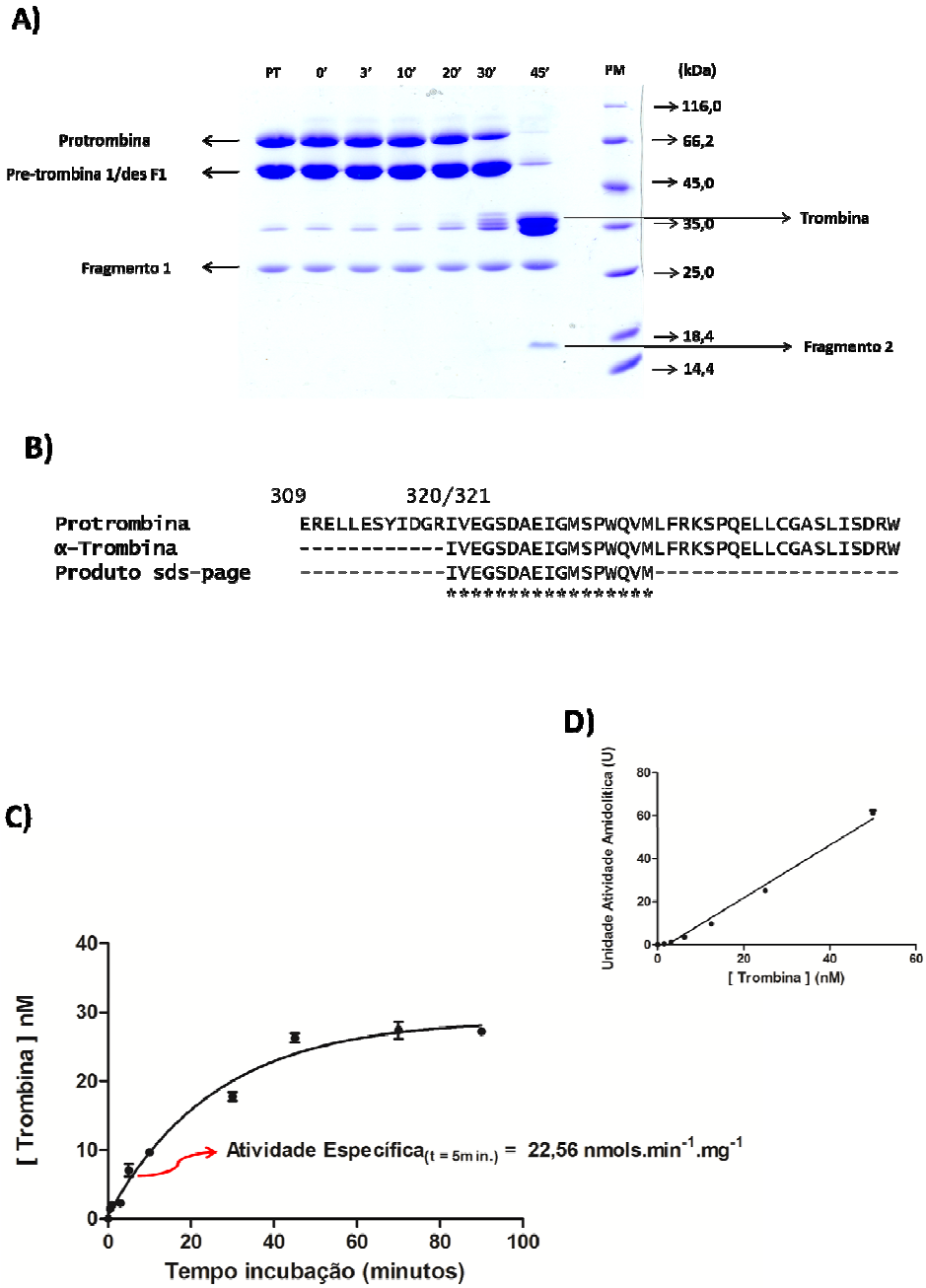



**Figura 25. Análise em SDS-PAGE dos fragmentos proteolíticos da Ativação de Protrombina e quantificação da Trombina formada.**

**A)** moojenactivase foi incubada com protrombina humana na razão enzima/substrato de 1:20 (m/m) em por diferentes tempos (0', 3', 10', 20', 30' e 45' minutos – ítem 3.2.5.2.2.) e aplicadas em gel SDS-PAGE (ítem 3.2.4.1.). Coluna 1: Protrombina (PT) apenas. PM – Padrão molecular. **B)** Alinhamento entre as sequencias N-terminal da banda ~36kDa (Trombina) e α-Trombina (|1BHX|B) e Protrombina (|XP_003815248.1|) humanas depositadas NCBi. **C)** Quantificação da produção de trombina (ítem 3.2.5.2.1.2.) e determinação da Atividade Específica moojenactivase (nmol.min$^{-1}$.mg$^{-1}$) sobre a protrombina no tempo de reação 5 minutos. **D)** Curva padrão Trombina humana ( $r^2$ = 0,985 ).

Já o perfil em SDS-PAGE observado para os produtos de proteólise da incubação moojenactivase/Fator X, mostra que a partir de 10 segundos de incubação pode-se observar o início da formação de Fator X ativado (FXa) representado pela banda de ~36 kDa (Fig. 26A). Essa ativação ocorre até o consumo completo do substrato com cerca de 10 minutos de incubação (Fig. 26A).

Assim como descrito para a Protrombina, a determinação da sequencia N-terminal de aminoácidos da banda do produto majoritário da incubação moojenactivase/Fator X (banda de ~36 kDa referente ao fator Xa) mostrou uma sequência de 5 resíduos os quais apresentaram 100% de identidade sequencial com a cadeia pesada da molécula de Fator Xa e com a molécula de Fator X a partir do resíduo Isoleucina 195. Esses dados também indicam não apenas a confirmação da formação do produto ativo Fator Xa, como também a capacidade da moojenactivase em clivar a molécula de Fator X entre os resíduos $Arg^{194}$-$Ile^{195}$ (Fig. 26B).

Similarmente aos resultados da analise em SDS-PAGE, a analise quantitativa de formação de Fator Xa, que foi quantificado pela relação de formação de Fator Xa com uma curva controle obtida a partir da atividade amidolítica do Fator Xa isolado (isolado de acordo com metodologia 3.2.5.2.1.2. – curva controle Fator Xa ilustrada na Fig. 26D), mostram que a formação máxima do Fator Xa ocorreu aproximadamente após 10 minutos de incubação (47,42 nM ± 1,3 nM Fator Xa), e mantendo com valores aproximados até 60 minutos (47,66 nM ± 1,3 nM Fator Xa - Fig. 26C). Ainda, a Atividade Específica para o Fator X, após 5 minutos de incubação, foi calculado em 116,34 nmols Fator Xa. $min^{-1}.mg^{-1}$ (Fig. 26C).

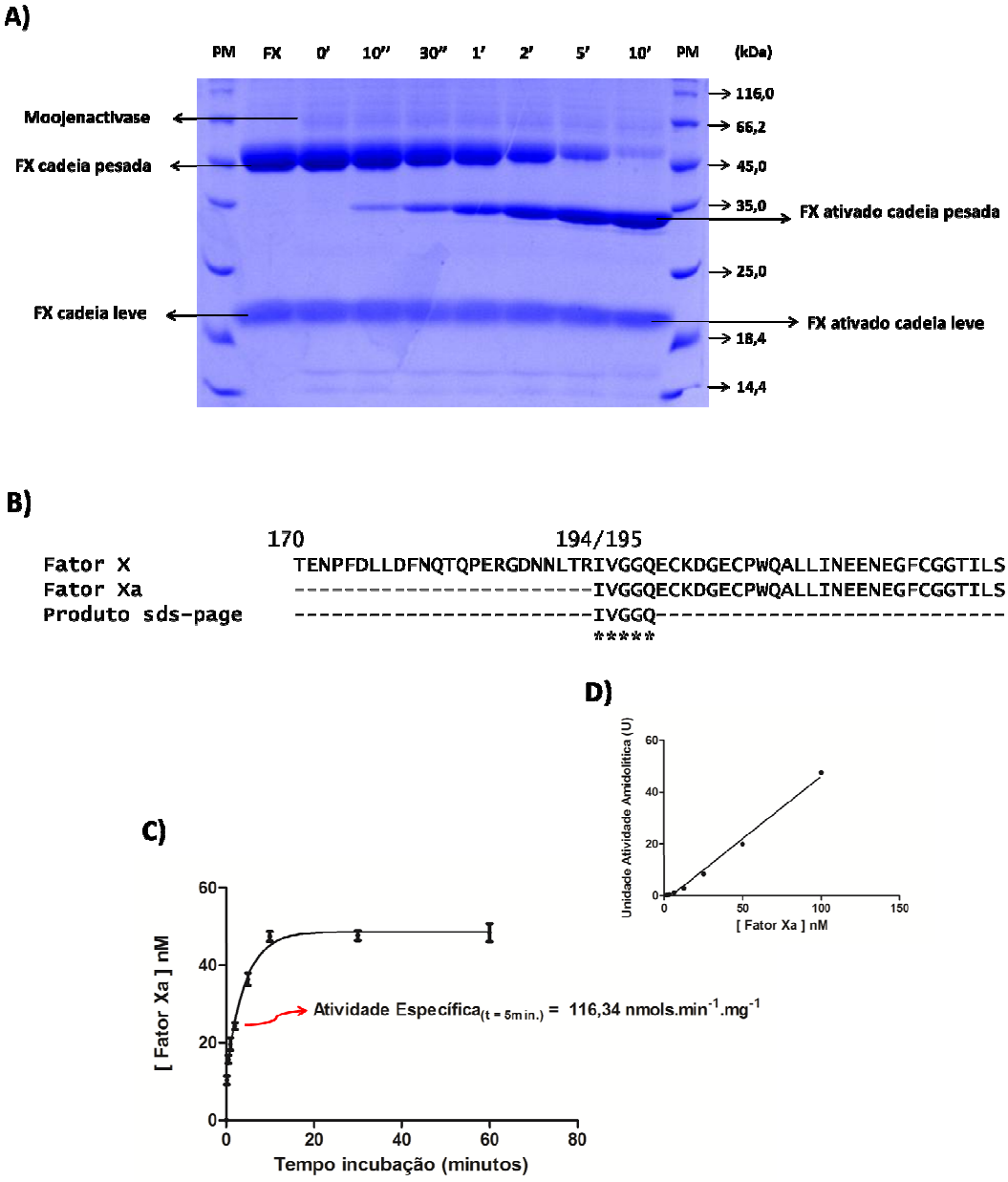



**Figura 26. Análise em SDS-PAGE dos fragmentos proteolíticos da Ativação do Fator X e quantificação do Fator Xa formado.**

**A)** Moojenactivase foi incubada com Fator X humano na razão enzima/substrato de 1:20 (m/m) por diferentes tempos (0', 10'', 30'', 1', 2', 5' e 10' minutos – ítem 3.2.5.2.2.) e aplicadas em gel SDS-PAGE (ítem 3.2.4.1.). Coluna 1: Fator X (FX) apenas. PM – Padrão molecular. **B)** Alinhamento entre as sequencias N-terminal da banda ~33kDa (Fator X ativado cadeia pesada), Fator X (AAH46125.1) e Fator Xa (1IQI_A) humanas depositadas NCBi. **C)** Quantificação da produção de trombina (ítem 3.2.5.2.1.2.) e determinação da Atividade Específica moojenactivase (nmol.min$^{-1}$.mg$^{-1}$) sobre a protrombina no tempo de reação 5 minutos. **D)** Curva padrão Trombina humana ( $r^2$ = 0,991 ).

**Obtenção de Fator X ativado (FXa)**

Para a determinação quantitativa da formação de Fator X ativado (Fxa) gerado a partir da clivagem do Fator X pela moojenactivase (citados no ítem acima 4.3.2.2.), foi necessária a obtenção do FXa uma vez que para os experimentos envolvendo a protrombina já tínhamos a disponibilidade de trombina humana isolada (Sigma).

Inicialmente, como descrito na metodologia 3.2.5.2.1.2 (mais especificamente no ítem referente à obtenção do fator X) a moojenactivase foi acolplada a uma resina de CNBr-Sepharose, a qual chamaremos a suspensão enzima-resina de MooA-Sepharose. Em seguida, Fator X foi incubado com MooA-Sepharose, onde uma alíquota do meio de incubação foi removida e a análise dos produtos de degradação submetidas à SDS-PAGE. Como ilustrado na figura 27A, podemos observar a formação parcial do Fator Xa ao longo do tempo de incubação, onde após 60 minutos, observa-se um consumo completo do substrato (Fig. 27A). Com o sucesso da ação proteolítica, novas incubações foram realizadas e um montante maior do Fator Xa obtido e após a troca de tampão (para retirar o inibidor de serinoprotease Benzamidina), o material foi submetido à cromatografia em coluna de afinidade Benzamidina. Na figura 27B obervamos um pico majoritário que aderiu à coluna e foi eluído após a adição do tampão de eluição (tampão glicina). A análise em SDS-PAGE (Fig. 27B) mostra pouca diferença entre o conteúdo proteico do material que foi aplicado à coluna (FXa pré Benzamidina) e o material eluído (FXa pós Benzamidina. Apesar disso, a avaliação da função enzimática de cada fração foi realizada onde a fração FXa pós Benzamidina apresentou um valor de atividade amidolítica maior (21.926,7 ± 1080 U/mg), que o material não submetido ao processo cromatográfico (17.307,0 ± 744,3 U/mg).

Levando em consideração os resultados obtidos, podemos concluir que o processo de formação de Fator X ativado a partir da clivagem do Fator X pela MooA-Sepharose foi eficiente, viabilizando essa tecinica como uma importante ferramenta na pesquisa envolvendo fatores de coagulação.

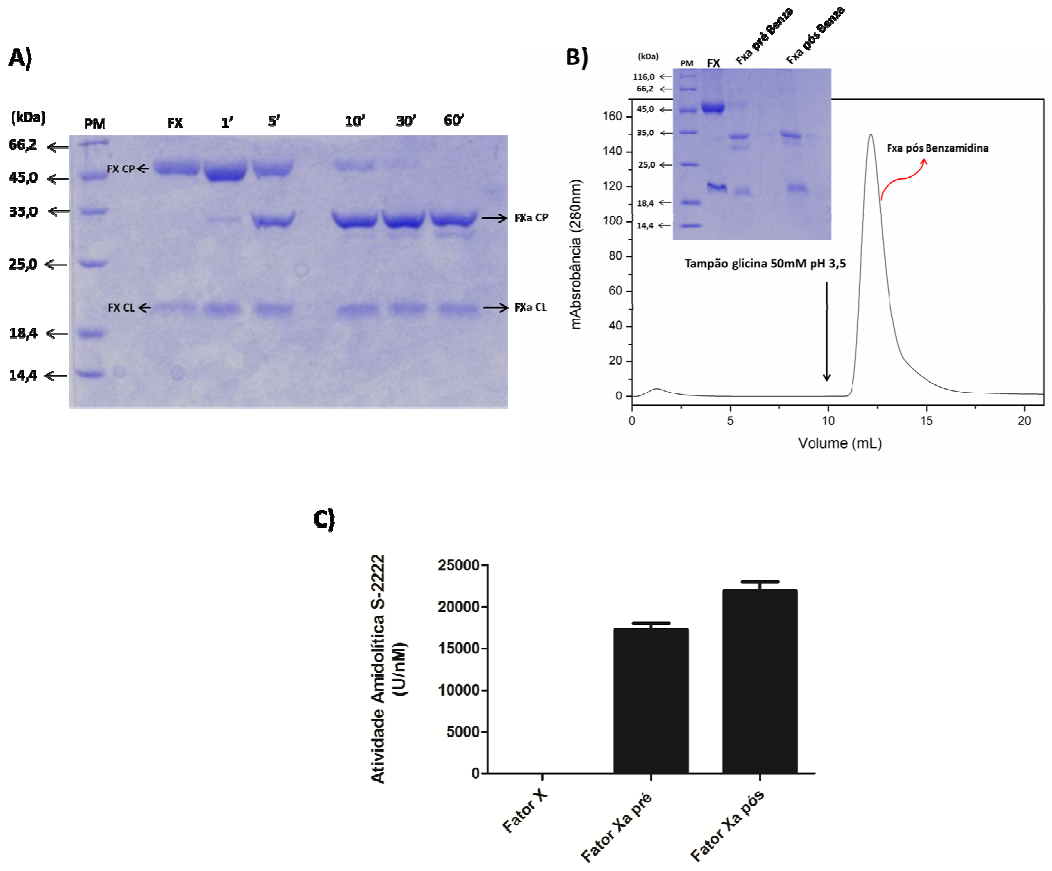



**Figura 27. Obtenção do Fator Xa.**

**A)** Análise em SDS-PAGE da formação de Fator Xa pela incubação MooA-Sepharose e Fator X após diferentes tempos de reação (1 à 60 minutos). As bandas referentes à Cadeia Leve (CL) e Pesada (CP) de ambas as formas (FX e FXa) estão indicadas. **B)** Perfil cromatográfico do material sobrenadante de reação submetido a coluna Benzamidina. O material foi aplicado (, onde o processo de lavagem do material não retido à coluna ocorreu por 10 minutos em tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 300mM coluna Benzamidina e o material retido foi eluido em tampão Glicina 50 mM pH3,5. A análise do conteúdo do material aplicado (Fator Xa pré Benzamidina) e material eluído da coluna (FXa pós Benzamidina) realizado por SDS-PAGE. **C)** Atividade Amidolítica do Fxa pré benzamidina e pós benzamidina. Fator Xa (5 nM) foi incubado com substrato S-2222 e a reação amidolítica monitorada (ítem 3.2.5.2.1.). Os resultados foram expressos pela média da Atividade Amidolítica ±EPM (U)/mg Fxa de ambos os materiais pré e pós Benzamidina.

#### 4.3.2.3 Atividade Fibrinogenolítica e formação coágulo fibrina

Dando continuação à avaliação da capacidade da moojenactivase em atuar sobre fatores da cascata de coagulação, a toxina foi incubada com fibrinogênio humano (Fator I da cascata de coagulação) por diferentes tempos e os produtos da proteólise avaliados em SDS-PAGE. A figura 28 mostra que a protease foi capaz de induzir uma rápida clivagem da cadeia α da molécula de fibrinogênio, com degradação em 20 minutos de reação, sendo a cadeia β clivada ao longo do tempo, com consumo total após 120 minutos (Fig. 28). No entanto, nas condições avaliadas, não foi possível visualizar a degradação da cadeia γ até 240 minutos de reação (Fig. 28).

Tendo em vista a capacidade de degradação das cadeias α e β da molécula de fibrinogênio, um ensaio de avaliação da formação de coágulo de fibrina a partir da incubação da protease com uma solução de fibrinogênio foi realizada (ítem 3.2.5.3.). Os dados dos tempos de coagulação da tabela IV mostram que a moojenactivase, nas concentrações avaliadas, não foi capaz de induzir a formação da rede de fibrina pela degradação do fibrinogênio em até 5 minutos (300 segundos) de reação. Por outro lado, a trombina humana (2,5 U/mL) foi capaz de induzir a coagulação do fibrinogênio em 43 segundos (Tabela IV).

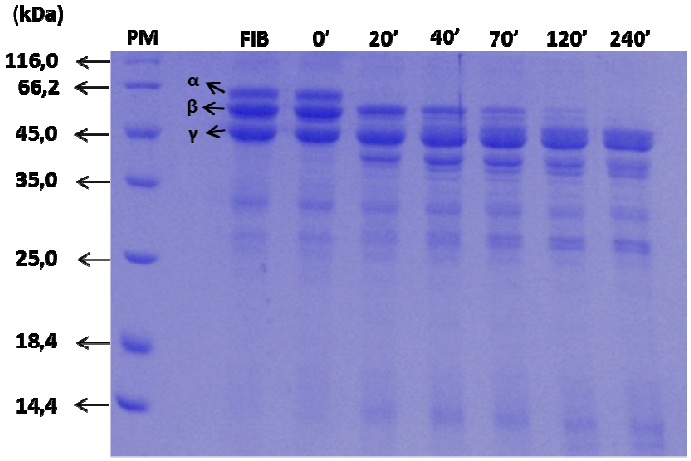



**Figura 28. Atividade fibrinogenolítica.**

moojenactivase foi incubada com fibrinogênio humano na proporção 1:20 (m/m) por diferentes tempos (0' à 240' minutos) e o produto da reação avaliado por SDS-PAGE (ítem 3.2.5.2.2. e 3.2.4.1.). Foram aplicados ao gel as amostras: Fibrinogênio apenas (Fib); Fibrinogênio + moojenactivase nos tempos 0'; 20'; 40'; 70'; 120'; e 240' (minutos).

## Tabela IV. Coagulação fibrinogênio.

| Enzima | [a]Tempo formação rede fibrina (segundos) |
|---|---|
| Trombina humana (2,5 U/mL) | 43,67 ± 5,52 |
| MooA (80 µg/mL) | > 300 |
| MooA (20 µg/mL) | > 300 |
| MooA (5 µg/mL) | > 300 |
| MooA (1,25 µg/mL) | > 300 |
| MooA (0,078 µg/mL) | > 300 |

[a] O tempo de formação do coágulo de fibrina foi monitorado em coagulômetro (ítem 3.2.5.3.) sendo os resultados expressos pelo tempo ± EPM (segundos) com n=3 para concentração de enzima (trombina ou moojenactivase – MooA) testada. A reação foi monitorada até 300 segundos.

### 4.3.3 Atividade coagulante sobre plasma humano normal e deficiente em Fator X

A avaliação da capacidade de coagulação plasmática da moojenactivase foi realizada utilizando-se um *pool* de PPP humano coletados de cinco doadores sadios e com valores de Tempo de Protrombina (média dos doadores 13,5 ± 1,2 segundos) e Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (média dos doadores 19,3 ± 4,4 segundos) dentro dos parâmetros para pacientes sem alterações de coagulação (WHO, 2012). Ainda, conjuntamente à análise em PPP humano sadio, foi utilizado PPP deficiente em fator X (Stago) para avaliação da capacidade de coagulação. Como observado na Figura 28 A e B, a protease foi capaz de induzir coagulação de ambos os plasmas (normal e plasma deficiente em Fator X – Stago) nas concentrações avaliadas, e de maneira dose dependente. No entanto, a moojenactivase apresentou uma dose coagulante mínima (concentração final da enzima capaz de induzir a coagulação do plasma em 60 segundos) de 3,93 µg/mL para o plasma normal (Fig. 29 A) e 1,02 µg/mL para o plasma deficiente em Fator X (Fig. 29 B).

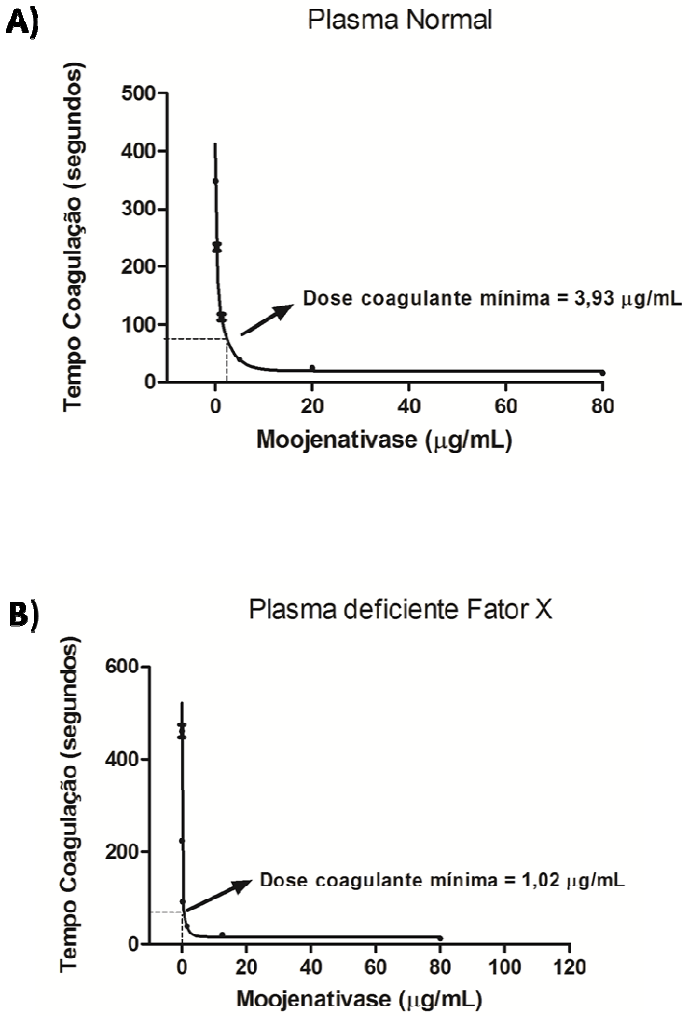



**Figura 29. Atividade coagulante sobre plasma normal e deficiente em fator X e obtenção da dose coagulante mínima.**

A avaliação do potencial coagulante da moojenactivase foi realizada pelo ensaio de coagulação plasmática descrito no ítem 3.2.5.3. *Pool* plasma pobre em plaqueta (PPP) humano normal **(A)** e PPP humano deficiente em Fator X **(B)** foram incubados com diferentes concentrações de moojenactivase (concentração final 80, 20, 5, 1,25, 0,31 e 0.078 µg/mL). A medida do tempo de coagulação foi monitorada em coagulômetro. O experimento foi realizado com n=6 para cada condição testada, em dois experimentos idependentes, e os resultados foram expressos pela média do tempo de coagulação (segundos) ± EPM por concentração de moojenactivase.

### 4.3.4 Atividade Fibrinolítica

Com o objetivo de determinar a capacidade fibrinolítica pela moojenactivase, a protease foi submetida ao ensaio de fibrinólise direta. Como observado na Figura 30, a protease (nas concentrações experimentais) não foi capaz de degradar a fibrina incorporada à placa de agarose e consequentemente formar um halo de lise assim como observado no controle com PBS (CN). Diferentemente, Plasmina (20 mU) utilizada como controle de indução de fibrinólise foi capaz de formar um halo de lise com 9,8 ± 1,2 mm diâmetro (Fig. 30).

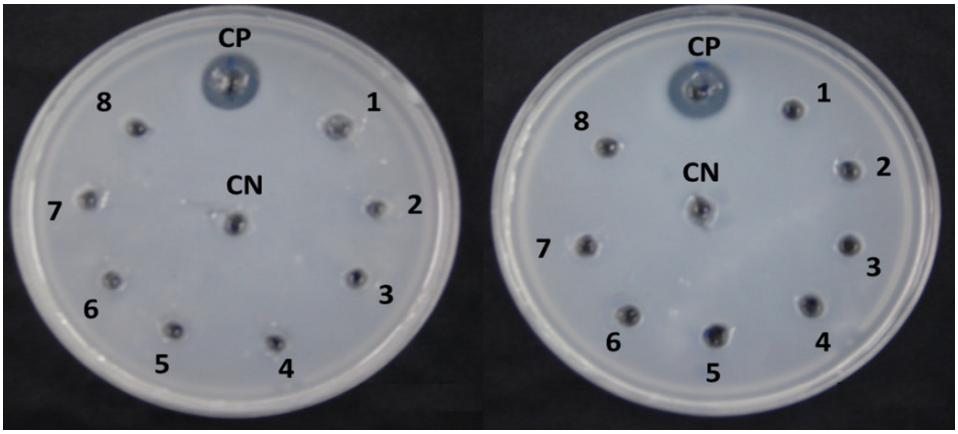



**Figura 30. Atividade fibrinolíticia.**

O ensaio foi realizado segundo metodologia 3.2.5.4. Aos poços formadso na placa foram aplicados 20 µL das soluções contendo: CP - Plasmina (20 mU); Poços 1 e 2 - moojenactivase-A 50 µg; Poços 3 e 4 - moojenactivase-A 25 µg; Poços 5 e 6 - moojenactivase-A 12,5 µg; Poços 7 e 8 - moojenactivase-A 6,25 µg; e CN – PBS (A). Duas placas foram utilizadas para o ensaio sendo as mesmas condições aplicadas às duas. A atividade fibrinolítica foi expressa pela medida do diâmetro do halo transparente formados pela lise da rede de fibrina ± EPM por dose de moojenactivase-A (n=4 cada dose), Plasmina (controle positivo CP - n=2) ou PBS (controle negativo CN – n=2) após 18 horas de incubação a 37ºC (B).

### 4.3.5 Agregação plaquetária

O ensaio de agregação plaquetária foi realizado utilizando suspensão de plaquetas lavadas uma vez que a moojenactivase é capaz de atuar sobre fatores da coagulação que possam interferir no processo de agregação, sendo esses fatores contidos no plasma rico em plaquetas (PRP), utilizados nos procedimentos padrões de agregação.

Inicialmente, como observado na Figura 31, a protease foi capaz de induzir a agregação de maneira dose dependente nas concentrações avaliadas (6,12 µg/mL: 6,94 ± 2,3%; 9,1 µg/mL: 65,56 ± 3,36%; 12,5 µg/mL: 82,18 ± 2,3%; e 25 µg/mL: 98,79 ± 2,9% de agregação). A trombina, como controle positivo, apresentou valor de 100% de agregação (Fig. 31). Ainda, quando previamente incubada com EDTA (10mM), a protease apresentou uma redução do potencial de agregação (cerca de 80% de inibição). Já quando pre incubada com Protrombina, o meio de incubação (moojenactivase + Protrombina + trombina formada) induziu um aumento da ordem de 8,31 vezes a função de agregação plaquetária (Fig. 31).

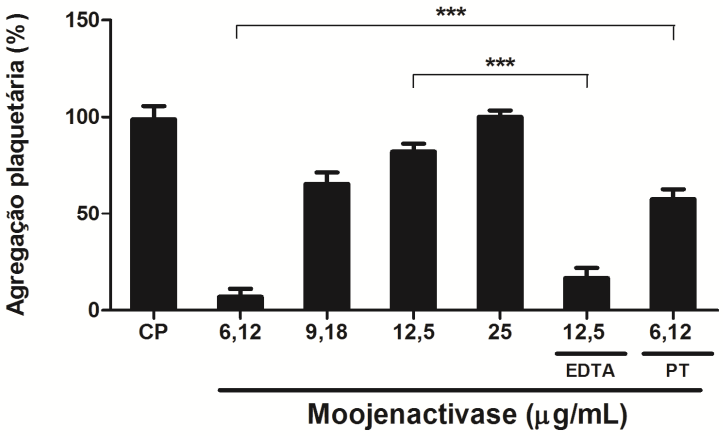



**Figura 31. Atividade de agregação plaquetária com solução de plaquetas lavadas.**

O ensaio de agregação foi realizado pela tecnica utilizando plaquetas lavadas (metodologia 3.2.5.5.), onde a moojenactivase foi avaliada em diferentes concentrações (6,12 – 25 µg/mL), e Trombina (0,5U/mL) foi utilizada como controle positivo. Para o ensaio de inibição, moojenactivase (12,5 µg/mL) foi previamente incubada com EDTA 10mM. Ainda, moojenactivase (6,12 µg/mL) e Protrombina (2,5 µg/mL) foram previamente incubadas e o material testado para atividade de agregação plaquetária.

### 4.3.6 Estimulação de leucócitos mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Com o objetivo de investigar a participação de leucócitos no processo pró coagulante induzido pela moojenactivase, PBMC foram cultivados na presença da protease e o perfil coagulante e a expressão de Fator tecidual (FIII) dessas células foram analisados, assim como a quantificação da citocina TNF-α e do FIII no meio de cultura produzidos por esses leucócitos.

Inicialmente, foi realizado um ensaio de viabilidade celular com a finalidade de avaliar o potencial citotóxico da moojenactivase. Como ilustrado na figura 32A, das concentrações analisadas, todas apresentaram valores de viabilidade celular estatisticamente iguais aos obtidos pelo grupo controle negativo. No entanto, a Cisplatina apresentou uma capacidade de indução de morte celular em cerca de 50 %, validando o ensaio (Fig 32A).

Sendo assim, PBMC foram estimulados por 24 horas na presença de moojenactivase, onde, após a incubação, o meio de cultura e as células (leucócitos aderidos e não aderidos à placa de cultura) foram coletados separadamente. As células, após lavagens exaustivas, foram submetidos à atividade pró coagulante, onde podemos determinar que, como ilustrado na figura 32B, os leucócitos estimulados com a protease nas concentrações analisadas foram capazes de reduzir o tempo de coagulação do plasma (moojenactivase 0,2 µg/mL: 187,3 ± 14,27s; 1 µg/mL: 133,2 ± 12,08s; 5 µg/mL: 116,0 ± 10,57s; e 25 µg/mL: 94,83 ± 3,2s) quando comparado aos leucócitos não tratados com a toxina (282,7 ± 16,76). Ainda, o mesmo perfil de indução de coagulação também foi observado para os leucócitos estimulados com LPS (108,7 ± 2,9s). No entanto, observa-se que os leucócitos tratados com a protease previamente submetida à incubação com EDTA (5mM) ou aquecimento à 100ºC, apresentam valores de indução de coagulaçao plasmática (moojenactivase + 100ºC: 281,2 ± 15,62s; e moojenactivase + EDTA: 304,7 ± 4,3s) semelhentes àqueles observados em seus controles respectivos (CN: 282,7 ± 16,76; e CN EDTA: 285,8 ± 7,2s, respectivamente).

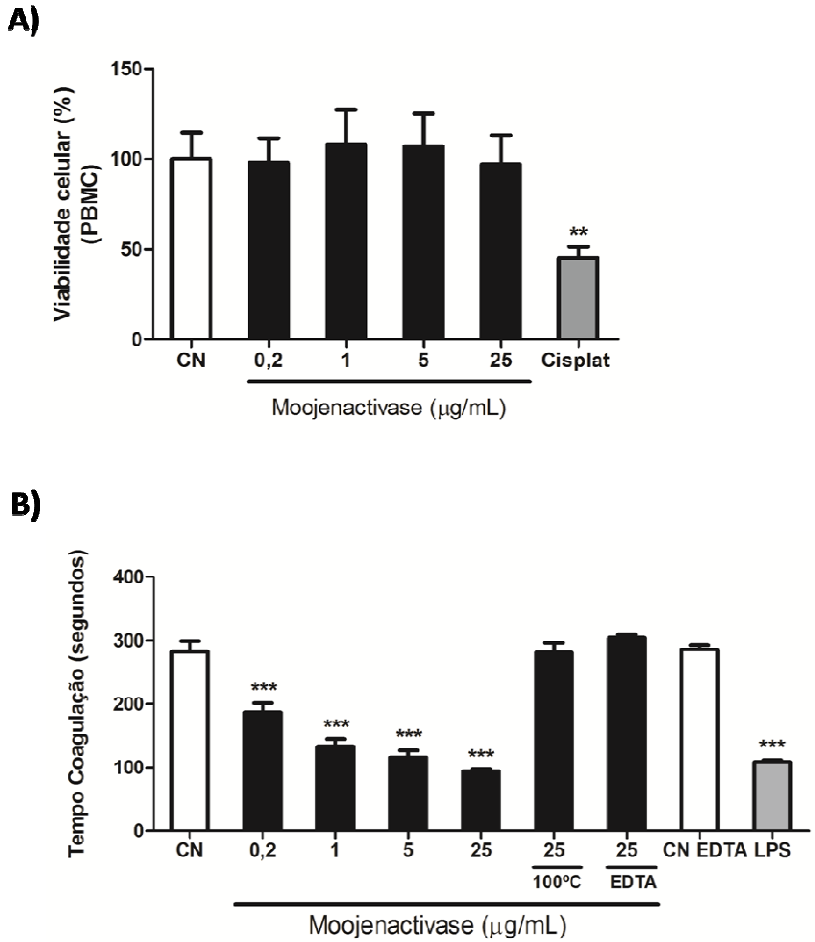



**Figura 32. PBMC tratados com moojenactivase: avaliação viabilidede celular e atividade pró coagulante das células.**

**A)** PBMC ($5x10^5$) foram e tratados com diferentes concentrações de moojenactivase (0,2 – 25 µg/mL) e a viabilidade avaliada 24 horas após, segundo metodologia de MTT (ítem 3.2.5.6.2.). Os resultados foram expressos pela média da porcentagem de viabilidade ± EPM, tendo o controle negativo (CN) como 100% viabilidade. $^{**}P<0,01$ quando comparado ao controle. **B)** PBMC desafiados com diferentes concentrações de moojenactivase, moojenactivase previamente tratada com EDTA, moojenactivase submetida à aquecimento ou LPS foram obtidos após a cultura e avaliados quanto a capacidade pró coagulante (3.2.5.6.4.). Os resultados foram expressos pelo tempo de coagulação (segundos) ± EPM. Em ambos experimentos (**A** e **B**) Os tratamentos foram realizados em triplicata, sendo os dados representativos de dois experimentos independentes (n = 6).

A partir dos dados obtidos, os quais evidenciam o aumento da capacidade pró coagulante de PBMC estimulados com a moojenactivase, foi investigada a expressão do fator tecidual (fator III da cascata de coagulação) a partir do material de lisado celular. A figura 33A ilustra a quantificação, onde é possível constatar o aumento na concentração de FIII do lisado de PBMC tratados com a toxina de maneira dose dependente (moojenactivase 0,2 µg/mL: 57,59 ± 5,78; 1 µg/mL: 117,5 ± 3,5; 5 µg/mL: 175,7 ± 17,7; e 25 µg/mL: 227,7 ± 12,8 pg/mL FIII). Apesar do LPS também ter apresetado um estímulo capaz de induzir o aumento na expressão de FIII (105,5 ± 3,7 pg/mL FIII), os estímulos com a protease nas concentrações de 25 e 5 µg/mL apresentaram maior eficiência de estimulação (Fig. 33A).

Já no sobrenadante da cultura de PBMC, TNF-α foi quantificado e, como ilustrado na Figura 33B, pode-se observar um aumento dose-dependente da liberação da citocina pelas células tratadas com a protease (moojenactivase 0,2 µg/mL: 236,5 ± 18,2; 1 µg/mL: 592,4 ± 91,1; 5 µg/mL: 808,4 ± 62,4; e 25 µg/mL: 934,5 ± 107,5 pg/mL TNF-α). Já o LPS, apresentou uma maior eficiência de estimulação da produção de TNF-α (1241 ± 126,0 pg/mL). Os tratamentos prévios da protease (EDTA e aquecimento) também foram capazes de inibir a produção da citocina apresentando valores próximos aos controles respectivos (Fig. 33B).

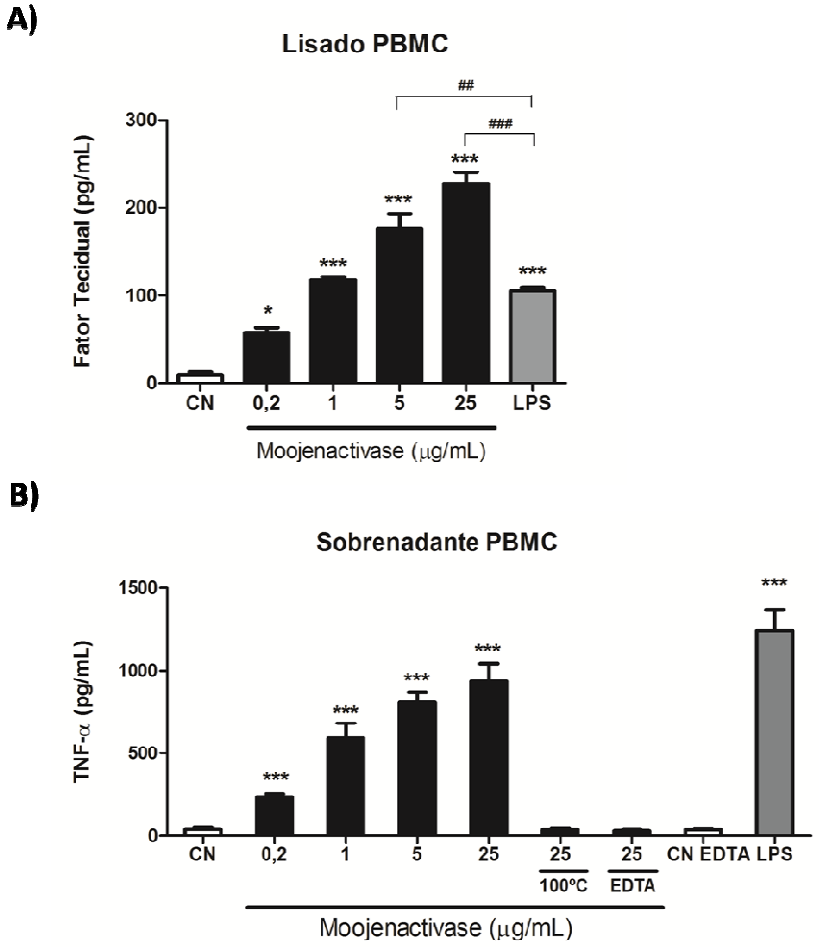



**Figura 33. Detecção do Fator Tecidual e TNF-α por ELISA.**

A quantificação do Fator Tecidual e de TNF- α foram realizadas pela técnica de ELISA (ítem 3.2.5.6.5.). **A)** A quantificação do Fator Tecidual (FIII) foi determinada a partir do lisado celular de PBMC tratados com moojenactivase ou LPS. Os valores de FIII foram expressos pela média da concentração ±EPM (pg/mL). Os tratamentos foram realizados em triplicata. $^{*}P<0,01$ e $^{***}P<0,001$ quando comparados ao Controle Negativo (CN). $^{\#\#}P<0,01$ e $^{\#\#\#}P<0,001$ quando comparado LPS aos tratamentos moojenactivase 5 e 25 µg/mL. **B)** Dosagem de TNF-α do sobrenadante de cultura de PBMC tratados com a moojenactivase em diferentes condições. Os tratamentos foram realizados em triplicata, sendo os dados representativos de dois experimentos independentes (n = 6). Os valores de TNF-α foram expressos pela média da concentração ±EPM (pg/mL). $^{***}P<0,001$ quando comparados ao respectivo controle negativo (CN).

## 4.4 Atividades funcionais *in vivo*

### 4.4.1 Atividade hemorrágica local

A habilidade de indução do processo hemorrágico local foi avaliada pela administração intradérmica da moojenactivase em camundongos. A Figura 34 ilustra os fragmentos do tecido cutâneo do local de onde foram feitas as administrações, dos quais apenas os animais desafiados com a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* apresentaram a formação de um halo hemorrágico no local (13,3 ±1,3 mm). Todas as doses de moojenactivase não foram capazes de induzir hemorragia no local (Fig. 34).

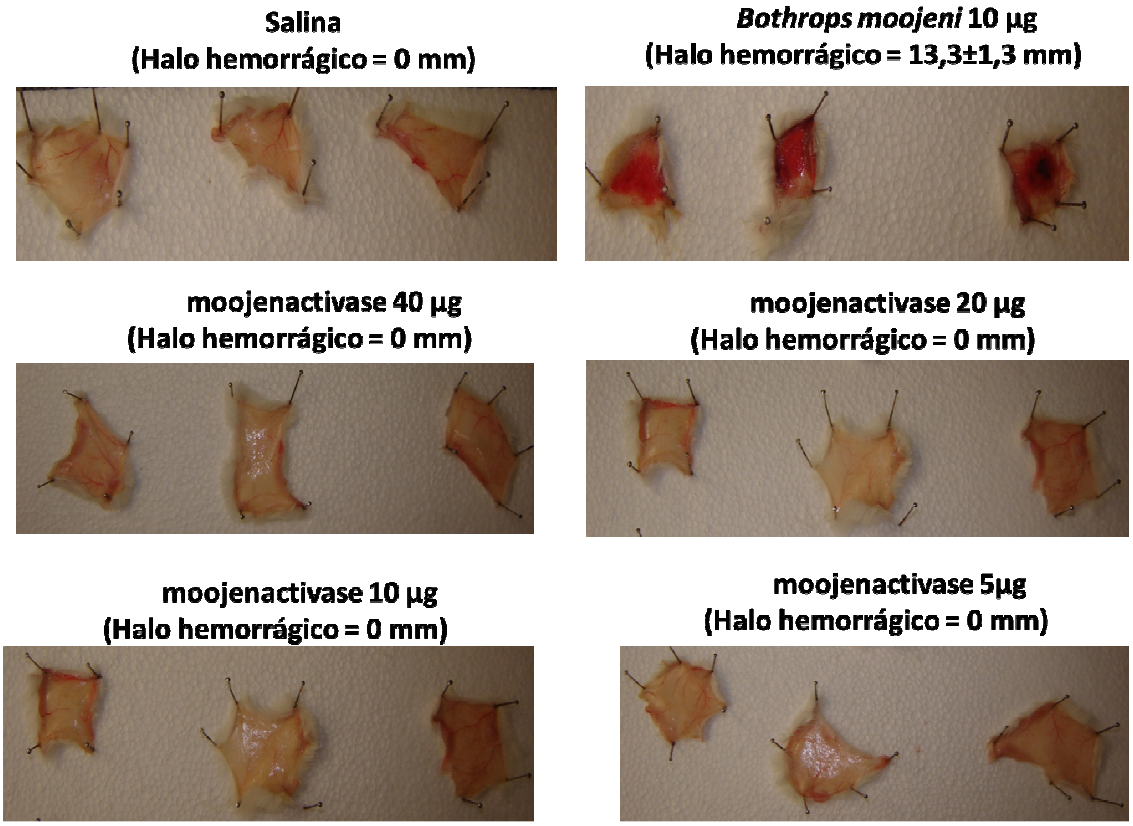



**Figura 34. Atividade hemorrágica local.**

A determinação da capacidade de indução de homarragia local foi determinada segundo método descrito (3.2.6.1.). Foram administrados 40, 20, 10 ou 5 µg de moojenactivase ou 10 µg de peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em 100 µL de salina estéril por injeção intradermica no dorso dos camundongos. A formação do halo hemorrágico foi analisada após 3 horas da administração. O diâmetro do halo hemorrágico formando foram medidos e expressos em mm. O grupo de animais administrados com solução salina constituíram o controle negativo. Os dados foram expressos pela média do diâmetro mensurado ± EPM com n = 3 para cada grupo de tratamento.

### 4.4.2 Avaliação de alterações hemostáticas

#### 4.4.2.1 Tempo de sangramento

Inicialmente, com o objetivo de testar a atividade potencial da moojenactivase sobre o sistema de coagulação, ratos machos e fêmeas foram administrados i.v. com diferentes doses de moojenactivase ou Salina estéril, e após 1 hora o tempo de sangramento medido. Como ilustrado na Figura 35, as doses de 3, 10 e 30 µg/Kg apresentaram um aumento do tempo de sangramento (2310 ± 288,4 segundos, 2700 ± 300 segundos e 2433 ± 347,4 segundos, repectivamente) quando comparado ao controle (618 ± 76,57 segundos). No entanto, durante a experimentação, alguns animais administrados nas doses de 10 e 30 µg/Kg foram a óbito em uma proporção de 14,28 e 42,85 %, respectivamente, e assim esses animais mortos não foram contabilizados e nem testados para o tempo de sangramento.

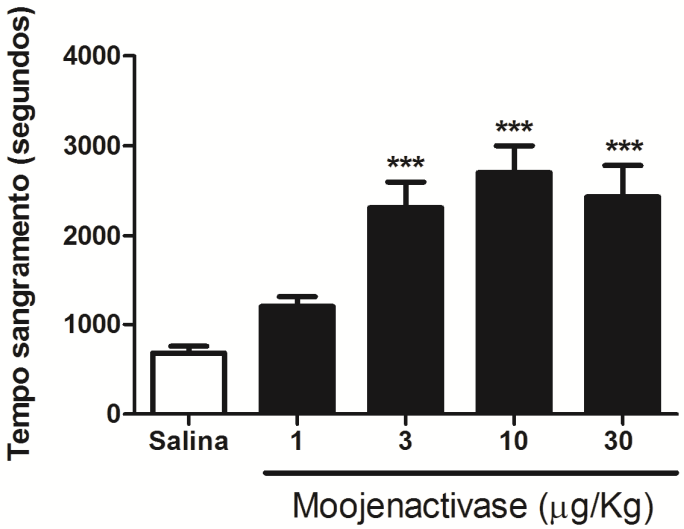



**Figura 35. Tempo de sangramento**

Para o experimento de tempo de sangramento, diferentes doses de moojenactivase (1, 3, 10 e 30 µg de protease / Kg de animal) administradas i.v. na veia caldal em ratos Wistar machos e fêmeas. Administração de Salina estéril foi utilizada como controle. Após 1 hora da administração, a medição do tempo de sangramento realizada. O experimento foi realizado em um n=6 animais (3 machos e 3 fêmeas) para cada grupo experimental e realizado em dois experimentos independentes. Os resultados foram expressos em tempo de sangramento (segundos) ± EPM. ***P<0,001 quando comparados ao grupo controle (salina).

#### 4.4.2.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos

A partir da análise dos resultados obtidos no experimento de tempo de sangramento, a dose de 3 µg/Kg foi escolhida para tratamento dos animais por ter sido capaz de promover alteração no sistema hemostático, além de não terem sido observadas mortes dos animais tratadas com a peoteases nessas condições. A avaliação hematológica dos animais administrados com moojenactivase, abrangeu as análises dos parâmetros de série branca, vermelha e parâmetros hemostaticos. Como ilustrado na Figura 36A, a análise da série branca, determinada pela contagem total e diferencial de leucócitos, mostra que os animais tratados com a protease apresentaram um aumento expressivo no número de leucócitos totais (11,74 ± 2,21 x $10^6$ leucócitos/ µL) quando comparado aos animais controle (5,52 ± 0,39 x $10^6$ leucócitos/ µL) após 1 hora da administração. Esse padrão aumentado manteve-se até 3 horas do desafio (8,45 ± 0,4 x $10^6$ leucócitos/ µL). Após 6 horas da administração é possível observar a regressão dos valores do número de leucócitos circulantes (Fig. 36A). A contagem diferencial de leucócitos seguiu o mesmo padrão de aumento do número de células para ambos os leucócitos (neutrófilos e mononucleares) (Fig 36B e C). Após 1 hora de administração, é possível observar um aumento dos níveis de neutrófilo (3,74 ± 0,4 x $10^6$ neutrófilos/ µL) e mononucleares (6, 5 ± 1,5 x $10^6$ mononucleares/ µL), onde observa-se que a proporção neutrófilos/mononucleares apresenta-se elevada indicando uma predominância do neutrófilo. Já após 3 horas de desafio, os neutrófilos se mantem aumentados (2,9 ± 0,18 x $10^6$ neutrófilos/ µL) quando comparado ao controle (1,8 ±0,13 x $10^6$ neutrófilos/ µL), onde os mononucleares voltam aos valores normais (4,31 ± 0,5 x $10^6$ mononucleares/ µL).

Dessa forma, assim como a contagem global, a contagem diferencial de leucócitos apresenta uma regressão ao estado normal após 6 horas da administração da toxina e mantendo-se estável até 24 horas (Fig. 36).

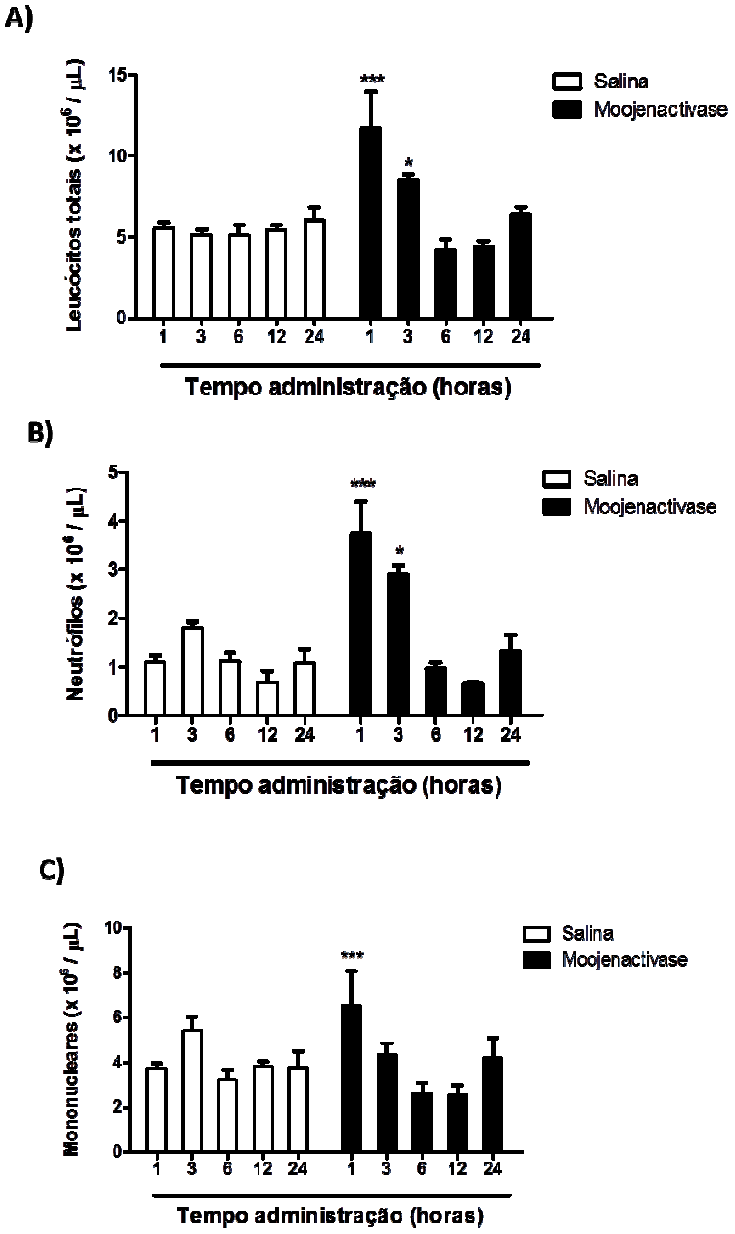



**Figura 36. Contagem de leucócitos totais e diferencial**

A contagem de leucócitos totais **(A)**, neutrófilos **(B)** e células mononucleares **(C)** a partir do sangue dos animais administrados com moojenactivase (3 µg/Kg) ou salina, foi realizada de acordo com metodologia 3.2.6.2.2. O experimento foi realizado com n=6 animais (3 machos e 3 fêmeas) para grupo tratado com Moojencativase e salina estéril e realizado em dois experimentos independentes. Os resultados foram expressos em número de células totais ± EPM. ***P<0,001, **P<0,01 e *P<0,1 quando comparados ao grupo controle (salina).

Dentre os parâmetros relacionados à hemostasia, a contagem de plaquetas sanguíneas mostra uma redução aguda do número de plaquetas nos animais administrados com a protease (230,2 ± 99,45 x $10^3$ plaquetas/ µL) quando comparado ao grupo controle administrado com salina (845,2 ± 59,7 x $10^3$ plaquetas/ µL), após 1 hora da administração (Fig. 37). As concentrações ainda permanecem reduzidas após 3 horas (511,4 ± 22,2 x $10^3$ plaquetas/ µL), sendo em 6 horas observado o regresso do estado normal de contagem de plaquetas sanguíneas (674,4 ± 26,0 x $10^3$ plaquetas/ µL).

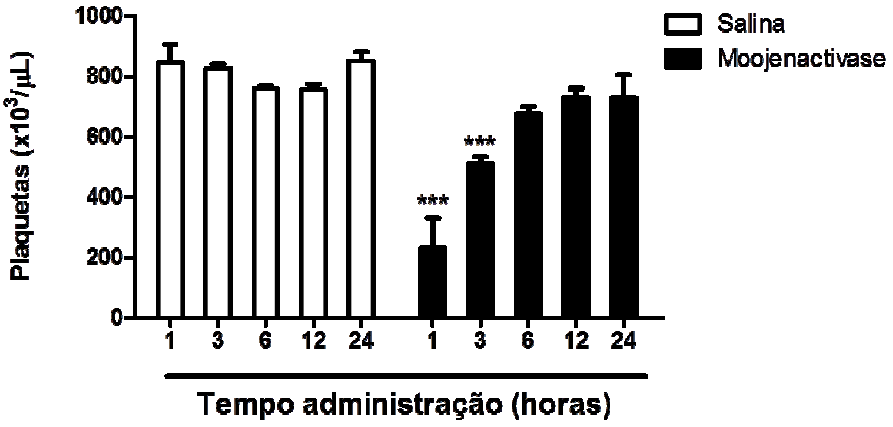



**Figura 37. Contagem de Plaquetas**

A figura ilustra a contagem de plaquetas a partir do sangue coletado dos animais administrados com moojenactivase-A (3 µg/Kg) ou salina. O experimento foi realizado em um n=6 animais (3 machos e 3 fêmeas) para grupo tratado com moojenactivase e salina estéril. O conjunto de dados é referente a dois experimentos independentes. Os resultados foram expressos em número de plaquetas totais/µL ± EPM. **P<0,01 quando comparados ao grupo controle (salina).

A análise dos ensaios do Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa), avaliam alterações hemostáticas relacionadas a disfunções no processo da cascata de coagulação (mais precisamente alterações sobre os fatores de coagulação). Como ilustrado na Figura 38A, o tempo de protrombina dos plasmas obtidos após 1 hora da administração com moojenactivase apresentam valores aumentados do tempo de coagulação (59,83 ± 3,7 segundos). Essa alteração ainda é observada até 6 horas após a administração da protease, onde os valores de coagulação dos plasmas continuam aumentados (26,53 ± 1,5 segundos), quando comparados ao controle respectivo

(18,56 ± 0,9 segundos) (Fig. 38A). Em 12 e 24 horas após as administrações, os valores de coagulação dos plasmas voltam ao normal (Fig. 38A).

Para o ensaio de TTPa (Fig. 38B), observa-se que os plasmas coletados dos animais 1 hora e 3 horas após a administração com moojenactivase, apresentam valores do tempo de coagulação prolongados (67,2 ± 8,1 segundos para 1 hora após administração; e 35,08 ± 4,7 segundos - 3 hora após administração). Diferentemente do ensaio do TP, os valores do TTPa voltaram ao normal após 6 horas da administração da protease (Fig. 38B).

A dosagem de fibrinogênio, ilustrada na Figura 38C, mostra que o Fator I da cascata de coagulação apresenta-se reduzido em maior intensidade 1 hora após a administração da protease (91,68 ± 11,0 mg/dL) mas também observando redução após 3 horas (217,4 ± 20,74 mg/dL) quando comparados aos respcetivos controles (289,28 ±4,7 e 294,5 ±11,3 mg/dL, respectivamente). A partir de 6 horas da administração da protease, observa-se a regularização no valores de concentração de fibrinogênio no plasma (Fig. 38C).

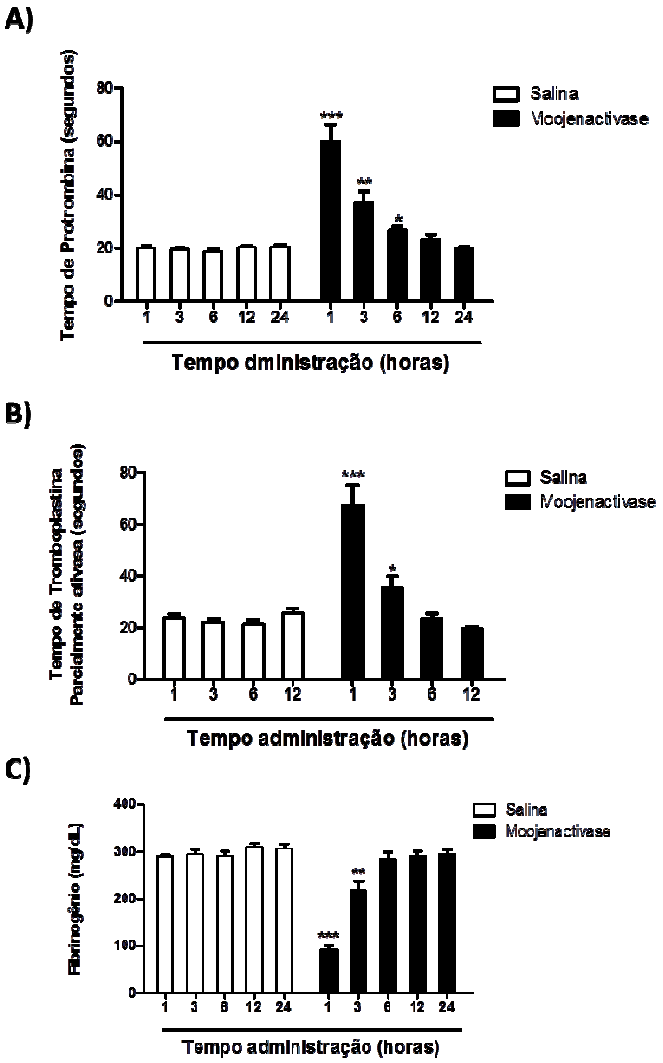



**Figura 38. Avaliação parâmetros de coagulação**

A figura ilustra a determinação dos tempos de protrombina **(A)**, tempo de tromboplastina parcialmente ativada **(B)** e concentração de fibrinogênio **(C)** a partir dos plasmas coletados dos animais administrados com moojenactivase (3 µg/Kg) ou salina. A metodologia empregada está descrita no ítem 3.2.6.2.2. O experimento foi realizado com um n=6 animais (3 machos e 3 fêmeas) para grupo tratado com Moojencativase e salina estéril. O conjunto de dados é referente a dois experimentos independentes. Os resultados foram expressos pela média do tempo de coagulação em segundo ± EPM **(A e B)** ou pela média da concentração de fibrinogênio ± EPM **(C)**. **P<0,01 e ***P<0,001 quando comparados ao grupo controle respectivo (salina).

Tendo em vista os resultados obtidos da avaliação dos parâmetros hematológico relacionadaos a série vermelha, observa-se que os valore para contagem de eritrócitos, hematócrito, Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) não apresentam alterações entre os animais administrados com moojenactivase ou salina, indicando que a protease não está envolvida em disfunções relacionadas ao eritrócitos (Fig. 39 A – F)

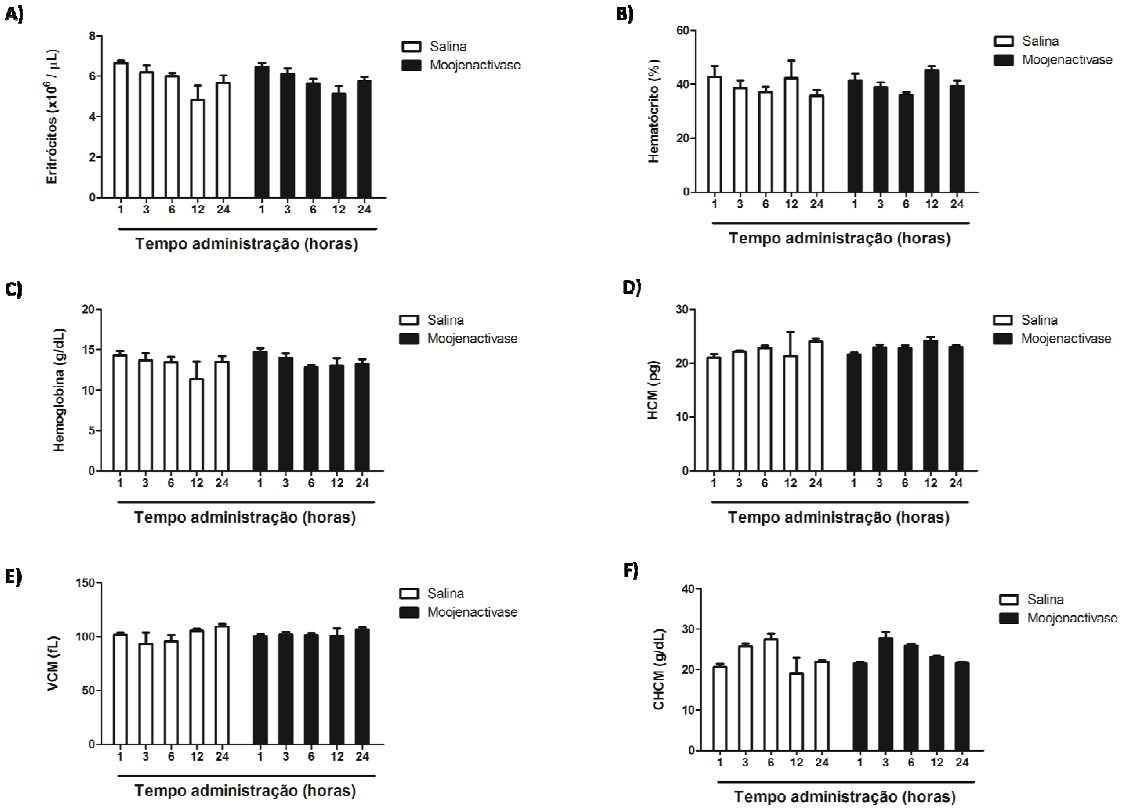



**Figura 39. Avaliação dos parâmetros da série vermelha**

A figura ilustra a determinação dos parâmetros de série vermelha: **(A)** contagem eritrócitos, **(B)** hematócrito, **(C)** concentração de hemoglobina, **(D)** hemoglobina corpuscular média (HCM), **(E)** volume corpuscular médio (VCM), **(F)** concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). A análise foi realizda partir do sangue total coletados dos animais administrados com moojenactivase (3 µg/Kg) ou salina. A metodologia empregada está descrita no ítem 3.2.6.2.2. O experimento foi realizado com um n=6 animais (3 machos e 3 fêmeas) para grupo tratado com moojenactivase e salina estéril. O conjunto de dados é referente a dois experimentos independentes. Os dados foram expressos pela mé dos valores de cada parâmetro.

# 5 DISCUSSÃO

## 5.1 Isolamento da moojenactivase

O envenenamento por serpentes peçonhentas podem induzir distúrbios de coagulação pela ação de toxinas, presentes na peçonha, que atuam sobre componentes da hemostasia. Dentre esses, os fatores de coagulação são alvos de proteases que atuam clivando a ligação peptídica entre aminoácidos em regiões específicas do zimogênio, dando origem aos fatores ativados capazes de induzir o processo de coagulação (White, 2005). Diversas serino e metaloproteases com a capacidade de ativar fatores da cascata de coagulação, como a protrombina (fator II) e o fator X, foram isoladas a partir da peçonha de serpentes, além de caracterizadas estruturalmente e funcionalmente (YAMADA et al., 1996; RAO et al., 2003; SAMEL et al., 2003; MODESTO *et al*., 2005; SENIS *et al*., 2006; BERGER *et al*., 2008; SUN et al., 2010; SUNTRAVAT et al., 2011). No entanto, ainda não existem relatos sobre o isolamento e caracterização de uma protease capaz de induzir a ativação dos fatores II ou X da coagulação a partir da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. Com o intuito de isolar uma protease capaz de atuar sobre fator(es) da cascata de coagulação da peçonha dessa serpente, o presente trabalho descreve pela primeira vez a purificação de uma metaloprotease da classe PIIId capaz de ativar as moléculas de protrombina e fator X, gerando os produtos ativos trombina e fator X ativado, a partir da peçonha de *Bothrops moojeni*.

Incialmente, a moojenactivase foi isolada pela sucessão de três procedimentos cromatográficos a partir da peçonha de *Bothrops moojeni*, em colunas de exclusão molecular (Sephacryl S-200 – Fig. 13A), interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose – Fig. 15A) e troca aniônica (ES 502N – Fig. 17A), sendo o material obtido de cada fração de eluição dos procedimentos avaliado quanto à presença de metaloprotease (por atividade caseinolítica na presença de EDTA – Fig. 14A, 16A e 18A) e a capacidade de ativação de protrombina (Fig. 14B, 15B e 16B). Como resultado do processo de purificação, foi possível obter uma metaloprotease ativadora de protrombina com um alto grau de homogeneidade a qual apresenta massa molecular de aproximadamente 89 kDa (Fig. 19C). A obtenção de uma metaloprotease de alto peso molecular e capaz de induzir a ativação de protrombina a partir da peçonha de *Bothrops moojeni* corrobora com resultados publicados por Perchuc e colaboradores (2005). No trabalho, o autor submeteu a peçonha de *B.*

*moojeni* a um procedimento cromatográfico em coluna C-18 de fase reversa, onde obteve 18 frações. Em uma análise preliminar, as 18 frações foram submetidas a uma metodologia de triagem de avaliação de 14 diferentes mecanismos de intervenção no sistema de coagulação sanguínea, onde uma fração de alto peso molecular (contendo proteínas de cerca de 40 à 100 kDa) apresentou uma expressiva atividade de ativação da protrombina (PERCHUC et al., 2005).

Ainda, quando avaliada a capacidade da moojenactivase em ativar outros zimogênios da coagulação, foi possível observar que a protease apresentou eficácia na ativação do fator X da cascata de coagulação (Tabela III). Suntravat e colaboradores (2010) realizaram um estudo com 28 peçonhas de serpentes da família Viperidea e Elapidea, onde analisaram a capacidade pró coagulante dessas peçonhas. Dentre os resultados obtidos pelo grupo de pesquisa, a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi capaz de induzir não apenas uma atividade pró coagulante sobre plasma humano, mas também foi capaz de ativar fator X, gerando fator X ativado. Esses dados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, mostrando que protease(s) presente na peçonha dessa serpente apresentam eficicácia em ativar fatores da cascata de coagulação, como os fatores II e X.

Apesar de apresentarmos o isolamento de uma única protease ativadora dos Fatores II e X, foi possível observar que durante os processos cromatográficos, principalmente na separação por interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose - Fig. 16A), diferentes frações daquelas que foram utilizadas para a purificação da moojenactivase também apresentaram função ativadora de protrombina, indicando a possível presença de outros componentes capazes de atuar por esse mecanismo. A presença de toxinas distintas com a capacidade de ativar protrombina já foi relatado em peçonhas de serpentes, como a partir da peçonha da serpente *Echis carinatus*, distribuídas pelo continente asiático, da qual foram isolados duas metaloproteases de altoa massa molecular capazes de ativar protrombina: Ecarina, com 55 kDa (KORNALIK & BLOMBACK, 1975 ) e Carinactivase-B, composta por um domínio com 62 kDa e ligado a um heterodímero com 17 e 14 kDa (YAMADA *et al*., 1996). A peçonha da serpente do gênero Echis é conhecida por apresentar uma alta atividade proteolítica, sendo composta, em cerca de 60% do peso seco da peçonha, por proteases que atuam sobre o sistema hemostático. Dessa forma, a presença de mais de uma protease capaz de ativar o fator II da coagulação na peçonha dessa

serpente justificaria o alto potencial coagulante da peçonha (PETROVAN *et al.*, 1997).

## 5.2 Caracterização Bioquímica

### 5.2.1 Análise bioquímica da moojenactivase

Como descrito anteriormente, a moojenactivase apresenta massa molecular, analisada por SDS-PAGE, de aproximadamente 89 kDa, sendo essa composta por cadeias de aproximadamente 66 kDa (cadeia pesada – CP), 17 kDa (cadeia leve β – CL β ) e 14 kDa (cadeia leve α – CL α) ligadas por pontes dissulfeto. A classe P-IIId das metaloproteases de peçonhas de serpentes (segundo FOX & SERRANO, 2008) é composta por uma subunidade principal (também chamada de cadeia principal ou cadeia pesada), a qual apresenta os domínios metaloprotease, desintegrina-*like* e rico em cisteína, ligada por pontes dissulfeto a um domínio lectina-*like* composto por um heterodímero αβ de baixa massa (geralmente cadeias 13 a 18 kDa, ou cadeia leves α e β). Esses dados indicam que a moojenactivase seja uma metaloprotease da classe P-IIId a qual apresenta uma subunidade principal (representada pela banda em SDS-PAGE de ~66 kDa) e outras duas compostas pelo heterodímero de lectina-*like* (nesse caso subunidades de 17 e 14 kDa - cadeia leves β e α, respectivamente). Dentre metaloproteases ativadoras de fatores de coagulação já isolados a paritr da peçonha de serpentes, o ativador do fator X isolada da serpente *Daboia russelli* (também conhecida como víbora de Russell) foi uma das primeiras proteases descritas com essa função (ESNOUF & WILLIANS, 1962). A RVV-X, como é conhecida, é uma metaloprtease da classe PIIId e apresenta cadeias de 59, 21 e 18 kDa. Outras metaloproteases ativadoras de fator X também foram isoladas como um ativador da peçonha de *Bothrops atrox* que consiste em uma metaloprotease com uma cadeia de pesada de 59 kDa, e outras duas de 14 e 15 kDa ligadas por pontes dissulfeto (HOFFMANN & BOM, 1986b) e o ativador de fator X isolado da peçonha de *Vipera beru berus*, a qual representa uma metaloprotease com massa molecular de 59 kDa em condições redutoras por SDS-PAGE e 126 kDa em condição não redutora (SAMEL et a., 2003), representando a classe PIIIc de metaloprotease. Já os ativadores de protrombina isolados da peçonha de serpentes, podemos citar o ativador de fator II isolado da peçonha de *Echis carinatus*, a Carinactivase-B (CA-B), que consiste de duas subunidades proteicas de 62 kDa e

uma subunidade de 25KDa composta por duas cadeias polipeptídicas de 14 e 17 kDa (metaloproteases da classe PIIId). Ainda, alguns ativadores de protrombina isolados a partir da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* também fazem parte da classe das proteases de alta massa molecular que pertencem à classe PIIIa (composta pelos domínios metaloprotease, desintegrina-like e rico em cisteína), como a Berythractivase, uma metaloprotease de 78kDa isolada de *Bothrops erythromelas* (SILVA *et al*., 2003), a Basparina A, uma metaloprotease isolada da peçonha de *B. asper* com massa molecular de 70kDa (LORIA *et al*., 2003). Esses dados mostram a variedade de metaloproteases isoladas de peçonhas de serpentes que apresentam estruturas distintas entre si, mas que demonstram uma mesma habilidade em ativar fatores da coagulação.

A moojenactivase é uma proteína ácida com pI de 4,92 (Fig. 19E), e ainda apresenta sitio(s) de N-glicosilação na CP na ordem de 20% em massa (Fig 19 D). A protease apresentou, ainda, uma recuperação proteica de 0,035% a partir da peçonha bruta de *B. moojeni*. Outros ativadores de fatores da coagulação também exibem características similares quanto ao pI e glicosilação, como a Basparina A, que também apresenta sítio(s) de N-glicosilação e um pI de 5,4 (LORIA *et al*., 2003). Já a VLFXa, uma metaloprotease da classe pIIId ativadora de fator X isolada da peçonha de *Vipera lebetina*, apresenta pI entre 5,9 e 5,6, além de sítios de glicosilação em todas as três cadeias (CP 57,7 kDa, CL 17,4 kDa e CL 14,5 kDa) (SIIGUR et al., 2001a). A RVV-X apresenta glicosilação na cadeia pesada (59 kDa) e em pelo menos uma das cadeias leves (21 e/ou 18 kDa) representando cerca de 13% da massa da molécula. Essa glicosilação apresenta grande importância na estrutura/função da protease, uma vez que a deglicosilação da RVV-X é responsável por uma mudança conformacional na estrutura secundária da protease, levando a uma perda da atividade de ativação do fator X (GOWDA et al., 1996; TANS & ROSING, 2001). Estudos de glicobiologia mostram a evidencia do enorme potencial dos carboidratos para codificar informação biológica (VARKI et al, 2009). Uma grande diversidade de estruturas de carboidratos tem sido detectada em associação com glicoconjugados solúveis (por exemplo as glicoproteínas), as quais estão associadas não apenas com a função intrínseca do glicoconjugado (isto é, no caso da RVV-X a função proteolítica é dependente da presença da glicosilação) mas também com a relação funcional em frente ao um sistema biológico (VARKI et al, 2009). Um exemplo são as lectinas, proteínas capazes de interagir com carboidratos específicos, que podem estar presentes nas superfícies

celulares e sendo capazes de reconhecer glicoconjugados solúveis podendo codificar várias informações biológicas (RÜDIGER et al., 2000). Ainda, a capacidade de glicoproteínas de interagirem com diferentes receptores biológicos (como leucócitos na circulação) podem favorecer a diminuição da taxa de depuração desse glicoconjugado, aumentando a biodisponibilidade plasmática da molécula e consequentemente seus efeitos biológicos (SINCLAIR & ELLIOT, 2005). Dessa forma, podemos inferir que a glicosilação das metaloproteases ativadoras de fatores da coagulação apresentam importância não apenas na função proteolítica, mas também podem auxiliar em outras funções biológicas das quais a porção glicana seja responsável. Ainda, a glicosilação pode auxiliar na diminuição da taxa de depuração da protease, fazendo com que essa passe a apresentar uma maior meia vida plasmática, aumentando a eficácia da ação sobre fatores de coagulação e consequentemente os efeitos de coagulopatias.

### 5.2.2 Sequenciamento de digestos trípticos da moojenactivase

O sequenciamento de aminoácido obtido dos 11 peptídeos trípticos a partir da moojenactivase (Tabela II) e seu alinhamento com outras proteases já isoladas e descritas em literatura científica (Fig. 20 e 21), confirmam que a protease pertença à classe de metaloproteases P-IIId por apresentar sequencias representativas dos domínios metaloprotese, desintegrina-like e lectina-like dessa molécula (Fig 21). Ainda, os dados evidenciam que a protease apresenta uma identidade sequencial elevada com outras toxinas (metaloproteases, desintegrinas-like e lectinas-like) da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* quando comparadas a metaloproteases de serpentes de outros gêneros. Sabe-se que as classes de toxinas das peçonhas de serpentes distribuídas por todo mundo compartilham similaridades nas sequências de aminoácidos, porém apresentando modificações pontuais que justificam a diferença funcional biológica entre essas proteínas (Zelanis et al., 2009). No entando, a variação ontogênica entre as classes de proteínas de um mesmo gênero de serpentes são menores daquelas encontradas em gêneros e famílias de serpentes distindas (LOMONTE et al., 2014), justificando os resultados observados para a moojenactivase.

A protease apresentou uma alta identidade com metaloproteases das classes PI e PIII isoladas da peçonha de *Bothrops* e, mais precisamente, com ativadores de protrombina como a Berythractivase e Insularinase A (isoladas das peçonhas de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops insularis*, respectivamente) (Fig. 20 e 21). Ainda,

pode-se observar que o sítio catalítico, representado pela tríade de Histidina e um resíduo de glicina (HEXXHXXGXXH), manteve-se altamente conservado quando comparado a outras metaloproteases do gênero. Os resíduos de aminoácido que compõem esse domínio catalítico são responsáveis pela coordenação do íon metálico (geralmente $Zn^{2+}$), e consequente ação catalítica por hidrólise do substrato (SILVA et al., 2003).

Já os fragmentos que apresentam identidade com dominínios desintegrina-like de metaloproteases ou com moléculas de desintegrina-like dissociadas (na forma livre, isto é, não conjugada com metaloproteases) apresentaram alta indetidade onde a moojenactivase apresentou os resíduos DCD em substituição à região RGD da classe das desintegrinas, onde também observada para outras proteases alinhadas como a Berythractivase (DCD), Bothropasin (ECD) e HF3 (ECD) (Fig. 21). O domínio RGD das desintegrinas é responsável pela função dessas proteínas, principalmente àquelas relacionadas com a interação com as αβ integrinas, importantes no processo de agregação plaquetária (WHITE, 2005). Sendo assim, a mudança no sítio RGD do domínio desintegrina-like pode induzir variações na função desse domínio quando comparado a desintegrinas-like que apresentam os resíduos RGD.

Os dados de sequenciamento a partir dos fragmentos trípticos obtidos das cadeias separadamente (representadas pelas bandas CP, CL α e CL β em SDS-PAGE) evidenciam a presença do domínio lectina-like (CL α e CL β) como ligado por pontes dissulfeto à CP. Os fragmentos representativos dos domínios lectinas-like da moojenactivase apresentaram alta similaridade à molécula de Alboagregina-A (uma lectina-like isolada da peçonha de *Trimerusus flavoridis*) e GPIb BP (porteína ligante de glicoproteína Ib – do inglês *Glycoprotein Ib Binding Protein*), uma lectina-like isolada da peçonha de *Bothrops jararaca* (Fig. 20).

## 5.3 Caracterização Funcional *in vitro*

### 5.3.1 Estabilidade e efeitos de íons e inibidores sobre a ativação de protrombina

Os experimentos realizados para a avaliação da estabilidade e o efeito de íons e inibidores sobre a atividade de ativação de protrombina consistiram na incubação prévia da moojenactivase em diferentes condições de pH, temperatura e

presença de íons e inibidores. Após a incubação, a reação entre a enzima incubada e a protrombina foi realizada em condições normais de pH (7,4) e temperatura (25ºC), e baixa concentração de íons e inibidores, caracterizando assim que os efeitos modulatórios (aumento ou diminuição da atividade) nas condições testadas indicam o efeito somente sobre a função proteolítica da moojenactivase e não sobre a protrombina. Dessa forma, os resultados obtidos indicam o caráter da protease relacionado à atividade funcional possivelmente sobre qualquer substrato (seja protrombina ou outro fator). Tendo em vista os resultados obtidos, observamos que a toxina apresenta-se estável quando incubada em condições de pH entre 6,0 a 8,0 e pH 10,5 (Fig. 22A). Porém, em condições com pH 3,5, 5,0 e 9,0, a protease apresentou uma diminuição da capacidade de ativação de protrombina (Fig. 22A). Ainda, incubações prévias da protease a temperaturas acima de 60ºC (60ºC e 100ºC) induziram uma perda da atividade de ativação de protrombina (Fig. 22B). Resultados similares foram obtidos para outras metaloproteases ativadoras de protrombina isoladas da peçonha de serpentes, como os ativadores de protrombina Berythractivase (*Bothrops erythromelas*) e Bothrojararactivase (*Bothrops jararaca*), as quais apresentaram atividade máxima em condições de pH entre 7,0 e 9,0 (SILVA *et al.*, 2003; BERGER *et al.*, 2008; SUN et al., 2010). Resultados similares também foram obtidos para a FIa, uma metaloprotease ativadora de fator X isolada da peçonha de *Daboia russellii siamensis*, a qual a atividade é reduzida pela incubação prévia da protease em temperatura acima de 60ºC e em condições de pH menor que 6,5 e maior que 8,5 (SUN et al., 2010).

A avaliação do efeito de íons divalentes na função da moojenactivase sobre a ativação de protrombina (Fig. 23), mostrou que a protease apresentou uma diminuição da atividade quando incubada com $CuCl_2$ (5 mM) apenas. Outras metaloproteases também apresentaram esse mesmo padrão de inibição, como a Brevilysin L6, isolada da peçonha de *Agkistrodon halys brevicaudus* (TERADA *et al.*, 1999). Esse efeito inibidor pode ser justificado pelo potencial oxidativo induzida por íons metálicos como o $Cu^{2+}$, de origem enzimática ou não, promovendo a oxidação de resíduos de aminoácidos da protease e induzindo uma mudança conformacional e consequente perda de atividade (KARLSTROM & LEVINE, 1991). Outra teoria seria que a presença desses íons $Cu^{2+}$ possam promover a perda da interação de ligação de hidrogênio entre resíduos de cisteína e resíduos de histidina ou fenilalanina, o que pode levar a uma perda na conformação molecular da protease

(KARLSTROM & LEVINE, 1991). Ainda, uma vez que resíduos de histidina são conhecidos por coordenarem a interação de íons de transição, uma coordenação com íons $Cu^{2+}$ podem levar a uma inativação reversível de enzimas, como metaloproteases que dependem de resíduos de histidina para sua função catalítica (HIGAKI et al., 1990).

Já os demais íons avaliados não foram capazes de alterar a atividade da Moojencativase, especialmente o $CaCl_2$, que mesmo incubado com diferentes concentrações (Fig. 23A e B), não foi eficaz em modular a atividade, indicando a não dependência desse íon pela protease e classificando-a como uma metaloprotease não dependente cálcio. Dentre os ativadores de fatores da cascata de coagulação, os ativadores de fator X VBFXAEII (*Vipera berus berus*) e VLFXA (*Vipera lebetina*) e o ativador de protrombina Cotiaractivase (*Bothrops cotiara*) são caracterizados como cálcio-dependentes (SIIGUR et al., 2001a; SAMEL et al., 2003; SENIS et al., 2006). Já os ativadores de protrombina Berythractivase (*Bothrops erythromelas*) e Insularinase A (*Bothrops insularis*) são caracterizados como cálcio não dependentes (SILVA et al., 2003; MODESTO et al., 2005).

O efeito de inibidores sobre a atividade da moojenactivase (Fig. 24). A redução da atividade de ativação de protrombina pela incubação prévia da protease com EDTA é um importante indicativo da dependência de íon(s) metálico para a ação proteolítica da enzima, uma vez que o EDTA é um conhecido quelante de íons metálicos, caracterizando assim a toxina como uma metaloprotease. Esse padrão de resposta frente à exposição ao EDTA é comum a diversas metaloproteases isoladas da peçonha de serpentes incluindo ativadores de protrombina e fator X isolados da peçonha de serpentes (GOVER-RIEMSLAG *et al.*, 1987; HOFMANN & BOM, 1987; SIIGUR et al., 2001a; LORÍA *et al.*, 2003; SAMEL et al., 2003; SILVIA *et al.*, 2003; MODESTO *et al.*, 2005; SENIS *et al.*, 2006; BERGER *et al.*, 2008; SUN et al., 2010), uma vez que essas proteases apresenteam o íon Zinco como íon metálico constitutivo na molécula.

Ainda, a não alteração da atividade da moojenactivase pela incubação prévia com Benzamidina (inibidor de serino proteases), E-64 (inibidor de tiol protease) e Fosforamidon (inibidor de metaloendopeptidases), exclui a capacidade de ação proteolítica por outro mecanismo que não o dependente de metaloprotease (Fig. 24). A inibição majoritária da atividade funcional da enzima pela incubação com SDS (10 mM) e DTT (10 mM) indicam que a estrutura conformacional da moojenactivase

apresenta grande importância para a atividade funcional, uma vez que o SDS atua como agente desnaturante o que afeta as interações consideradas fracas da proteína podendo gerar um desnovelamento protéico, e o DTT que atua como agente redutor pois é capaz de reduzir a ligação entre resíduos de cisteínas, que formam a ponte dissulfeto, alterando a conformação estrutural a nível secundário, terciário e quaternário da protease, e inativando-a (Fig. 24). A incapacidade de alterar a atividade da moojenactivase pela incubação com solução de citrato de sódio nas mesmas concentrações em que essa atua como anticoagulante (13,6 mM), nos permite inferir que durante os experimentos de coagulação utilizando plasma citratado (os quais serão discutidos adiante), a presença do anticoagulante no plasma não interfere na atividade da protease.

A molécula $\alpha_2$-macroglobulina é um importante inibidor plasmático de proteases que atua inibindo fatores ativados do sistema de coagulação, como a trombina e o fator X ativado. Assim, a manutenção da capacidade de ativação de protrombina mesmo com a incubação prévia da moojenactivase com $\alpha_2$-macroglobulina, mostra que esse inibidor plasmático não é capaz de inibir a toxina, sugerindo um maior potencial de ação da metaloprotease sobre o sistema hemostático *in vivo*. Nesse aspecto a moojenactivase difere-se de outras metaloproteases, principalmente aquelas classificadas na classe P-I, como a BaP1 isolada da peçonha de *Bothrops asper* (ESCALANTE *et al*., 2004) e a Mutalysin II isolada da *Lachesis muta muta* (SOUZA *et al*., 2001), as quais são inibidas por inibidores plasmáticos como a $\alpha_2$-macroglobulina, apresentando atividade em sistema biológico reduzida ou completamente inibida principalmente a nível de efeitos relacionados a coagulopatias (SOUZA *et al*., 2001; ESCALANTE *et al*., 2004).

Interessantemente, ainda na abordagem do efeito de inibidores sobre a atividade da moojenactivase, os resultados ilustrados na Figura 24 mostram que o soro anti-ofídico polivalente anti botrópico/crotálico foi capaz de reduzir a atividade da protease. Esse resultado apresenta uma importante relevância tendo em vista a eficácia da principal terapia anti-ofídica (o soro anti-ofídico) em inibir, nas condições testadas, a ação da moojenactivase sobre a ativação da protrombina. Ainda, esses dados indicam que a protease apresenta um caráter imunogênico, diferentemente de outros componentes protéicos de peçonhas de serpente (STEPHANO *et al*., 2005),

indicando que o soro anti-ofídico apresenta anticorpo(s) capaz(es) de inibir a moojenactivase.

### 5.3.2 Moojenactivase ativa os fatores II e X da cascata de coagulação

Diversas metaloproteases que atuam no processo de hemostasia estão relacionadas com a ação sobre diferentes zimogênios da cascata de coagulação (WHITE, 2005). A ação proteolítica induz a clivagem dos fatores na forma de zimogênio, gerando a forma ativada, as quais podem atuam como agentes pró ou anti coagulantes ou sobre o sistema de fibrinólise (SIIGUR *et al.*, 2001b; GORNITSKAIA et al.,2003; LORÍA *et al.*, 2003; BERGER *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2010; NAKAYAMA et al., 2011). Dessa forma, com o objetivo de avaliar a capacidade da moojenactivase em ativar diferentes zimogênios que participam da coagulação, o ensaio de ativação sobre o Fator X, Protrombina, Plasminogênio e Proteína C (Tabela III) foi realizado, onde os resultados mostram que a protease atua não apenas sobre a protrombina (como já determinado), mas também sobre o Fator X.

A não ativação da Proteína C indica que possivelmente a protease não induz ao mesmo tempo a ativação de fatores pro e anti coagulantes, uma vez que a Proteína C que quando ativada gera Proteína C ativada responsável pela degradação do Fator V ativado, inativando-o, e consequentemente impedindo a coagulação (ROBERTS *et al.*, 2006). Ainda, a incapacidade da moojenactivase em gerar plasmina a partir do plasminogênio indica que a protease não atua indiretamente sobre o processo de fibrinólise, uma vez que a plasmina é responsável pela degradação da rede de fibrina (ROBERTS *et al.*, 2006).

Outras proteases isoladas da peçonha de serpentes apresentaram um padrão de ativação de mais de um fator da cascata. A Insularinase-A, um ativador de protrombina isolada da peçonha de *Bothrops insularis*, é capaz de ativar tanto a protrombina quanto fator X, com uma maior eficácia sobre a ativação da protrombina (MODESTO *et al.*, 2005). Outras metaloproteases que podemos citar é a VLFXA, um ativador de fator X isolada da peçonha de *Vipera lebetina*, e a RVV-X, isolada da peçonha de *Daboia russelli*, que atuam sobre os fatores X e IX da cascata de coagulação (LINDQUIST et al., 1978; ESNOUF & WILLIANS, 1962; SIIGUR *et al.*, 2001a). Os fatores em questão (Fator X, Fator IX e Protrombina) pertencem à classe dos fatores de coagulação dependente de vitamina-K, os quais apresentam uma

estrutura similar entre si composta por diferentes domínios, como o domínio Gla na região N-terminal (Fig. 6) o qual é passível de sofrer modificações pós-traducionais como a γ-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico (Glu), convertendo-os em resíduos de ácido γ-carboxiglutâmico (Gla). Essa γ-carboxilação do domínio Gla apresenta uma grande importância funcional para esses fatores, uma vez que esse domínio é responsável por mediar a interação do fator de coagulação a lipídios de membrana (principalmente fosfatidilserina) o que leva a um aumento da atividade catalítica da forma ativa do zimogênio (ROBERTS et al., 2006). Estudos a partir da estrutura terciária das moléculas de RVV-X (ativador de fator X - MORITA *et* al., 1998) e Carinactivase-1 (ativador de protrombina - YAMADA *et al*., 1996), duas metaloproteases da classe P-IIId, mostraram que os domínios lectina-*like* presente nessas metaloproteases são responsáveis pela interação com os resíduos γ-carboxilados de ácido glutâmico (domínio GLA – ver Fig. 6) presentes nas moléculas de fator X e protrombina, respectivamente. Assim, a presença desse domínio lectina-*like* capaz de interagir com o domínio GLA de fatores de coagulação dependentes de vitamina K podem ser úteis por apresentarem uma função ancoradora das metaloproteases PIIId (como a moojenactivase), permitindo assim, uma maior eficiência de ativação desses fatores (MORITA, 2004b).

O perfil de proteólise da molécula de protrombina foi analisado por SDS-PAGE pela incubação moojenactivase/protrombina (Fig. 25A), sendo o principal produto formado, analisado pelo sequenciamento N-terminal de aminoácidos (Fig. 25B). Dos resultados obtidos, podemos concluir que a protease apresentou uma preferência de clivagem pela molécula de protrombina, quando comparada à molécula de Pré trombina 1/des F1 (um produto de clivagem da protrombina que também está na forma de zimogênio e está presente no reagente obtido da Calbiochem), dando origem a um produto com massa de aproximadamente de 36 kDa possivelmente referente à trombina (Fig. 25A). Quando essa banda em SDS-PAGE foi eletrotransferida a uma membrana de PVDF e analisada a sequencia N-terminal de aminoácidos, foi possível concluir que a protease é capaz de clivar a molécula de protrombina na posição $Arg^{320}$-$Ile^{321}$ (Fig. 25B). Porém, para a formação da molécula de α-trombina, uma segunda clivagem é necessária entre os resíduos $Arg^{271}$-$Thr^{273}$, a qual não foi possível avaliar no presente trabalho. A observação da formação de produtos da ativação da protrombina por metaloproteases de peçonha

de serpentes por SDS-PAGE é um processo comum de análise dos fragmentos. Porém a análise de sequenciamente dos produtos gerados não é uma técnica comum aos trabalhos referentes a caracterização das protease, contudo os artigos assim mesmo indicam uma possível região de clivagem pela análise das bandas de proteólise em SDS-PAGE. Dos ativadores de protrombina isolados da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*, a Basparina A e a insularinase A foram capazes de induzir a formação de trombina também possivelmente pela clivagem entre os resíduos $Arg^{320}$-$Ile^{321}$, gerando inicialmente meizotrombina/des F1 (a qual é cataliticamente ativa), e por ação de autoproteólise do produto gerado, tem-se a formação de trombina (LORÍA et al., 2003; MODESTO et al., 2005). No entanto, na análise dos produtos de proteólise moojenactivase/protrombina (Fig. 25A), a banda referente a Pre trombina 1 /des F1 não apresenta aumento na intensidade enquanto ocorre a clivagem da banda referente a protrombina, indicando que a protease não induz a formação de Pre trombina1/des F1 a partir da protrombina. Dessa forma, podemos inferir que a protease também possa atuar entre os resíduos $Arg^{271}$-$Thr^{273}$ concomitantemente à clivagem entre os resíduos $Arg^{320}$-$Ile^{321}$, uma vez que para a formação de α-trombina pela moojenactivase não foi observada a formação de nenhum outro produto intermediários (Fig. 25A). Resultados similares foram obtidos para o ativador de protrombina isolado da peçonha de *Notechis scutatus scutatus* (TANS et al., 1985), o qual indica que a capacidade de clivagem do ativador seria sobre os resíduos $Arg^{320}$-$Ile^{321}$ e $Arg^{271}$-$Thr^{273}$ da molécula de protrombina, devido a não formação d produtos intermediários sendo apenas a trombina.

Ainda, o cálculo da atividade específica da moojenactivase sobre a protrombina foi calculado em 22,56 nmols trombina. $min^{-1}.mg^{-1}$ (Fig. 25C). Comparando com outros ativadores de protrombina, o ativador de protrombina isolado da serpente *Oxyuranus scutellatus* apresenta valor de atividade específica de 3.500 (nmols trombina. $min^{-1}.mg^{-1}$ – SPEIJER et al., 1986), o ativador de protrombina isolado da peçonha de *Notechis scutatus mutatu* atividade específica de 26.000 (nmols trombina. $min^{-1}.mg^{-1}$ – TANS et al., 1985) e a Aharin (isolada da peçonha de *Agkistrondon hallys pallas* – ZHANG et al., 1998) com atividade específica de 1,2 (nmols trombina. $min^{-1}.mg^{-1}$), indicando que a moojenactivase apresenta uma atividade relativamente moderada quando comparada a alguns ativadores de protrombina.

Quando avaliado o perfil dos produtos gerados da reação moojenactivase/Fator X (Fig. 26A) e analise da sequência N-terminal do principal produto da clivagem do fator X (Fig. 26B), concluímos que a moojenactivase é capaz de clivar a ligação entre os reíduos $Arg^{194}$-$Ile^{195}$ da molécula de fator X, gerando o fator X ativado (Fig. 26B). Esse ponto de clivagem é comoum para os complexos Fator VIIa/Fator tecidual e Fator IXa/Fator VIIIa, os quais no processo de coagulação fisiológica atuam ativando o fator X. Assim como para a protrombina, a observação da formação de produtos de proteólise do fator X por metaloproteases de peçonha de serpentes por SDS-PAGE é um processo comum de análise dos fragmentos, onde dos ativadores aqui descritos, todos apresentam o mesmo padrão de formação dos produtos assim como a moojenactivase. Porém, apenas para os ativadores VAFAX-I e VAFAX-II (isolados da peçonha de *Vipera ammodytes ammodytes*) e VLFXA (isolado da peçonha de *Vipera lebetina*) a análise da sequência de aminoácidos dos produtos formados foi determinada, onde essas proteases também apresentaram o padrão de clivagem do fator X entre os reíduos $Arg^{194}$-$Ile^{195}$ (SIIGUR et al., 2001a; LEONARDI et al., 2008).

Já a Atividade Específica para o Fator X foi de 116,34 nmols Fator Xa. $min^{-1}.mg^{-1}$ (Fig. 26C). A atividade específica de ativação do fator X também foi determinada para outros ativadores como a RVV-X (433 nmols FXa. $min^{-1}.mg^{-1}$), VAFXA-I (1,34 nmols FXa. $min^{-1}.mg^{-1}$), VAFXA-II (0,0036 nmols FXa. $min^{-1}.mg^{-1}$) e o ativador de protrombina da peçonha de *C. cerastes* (110 nmols FXa. $min^{-1}.mg^{-1}$). Esses resultados mostram que a moojenactivase apresenta valores de atividade enzimática relativamente próximo quando comparado aos principais ativadores de fator X isolados.

### 5.3.3 Produção de Fator X ativado pela moojenactivase

Para os ensaios de atividade específica sobre o fator X, houve a necessidade da obtenção do fator X ativado (FXa) como controle para calcular a formação do produto. Para isso, foi empregado procedimentos de incubação moojenactivase/fator X, induzindo a formação do FXa e consequente isolamento do mesmo. Inicialmente, o acoplamento da protease em resina Sepharose (MooA-Sepharose) foi bem sucedido uma vez que a moojenactivase ligada à resina manteve a atividade, e o meio MooA-Sepharose apresentou capacidade de formação de FXa a partir do fator X (Fig. 27A). Ainda, após submeter o produto da reação MooA-Sepharose/fator X

(FXa pré Benzamidina) a uma coluna de afinidade em resina Benzamidina, observamos que a fração retida à coluna (FXa pós Benzamidina) apresentou um aumento na atividade amidolítica, indicando uma eficiência no procedimento cromatográfico (Fig. 27B). A fração final (FXa pós Benzamidina) correspondendo ao FXa apresentou um alto grau de homogeneidade, indicando a eficiência do procedimento de obtenção do FXa (Fig. 27C).

Fatores de coagulação ativados, como o próprio FXa e a trombina, são reagentes muito utlilizados em pesquisas científicas, assim como em produtos para diagnósticos clínicos. O FXa é comercializado por diversas empresas, como a empresa Haemochrom Diagnostica, que comercializa o FXa (produto HFXA 1011) obtido através da ativação do fator X pela peçonha de *Daboia russelli*, a qual é composta pelo ativador de fator X RVV-X (de acordo com manual do fabricante - Haemochrom Diagnostica). Ainda, a empresa Haematologic Technologies Inc. também comercializa o FXa (HCXA-0060) obtido pela ativação do fator X pela RVV-X isolada. O por essa empresa, o FXa é isolado do meio de incubação pela associação de procedimento cromatográfico em coluna de Benzamidina-Sepharose e exclusão molecular (de acordo com manual do fabricante - Haematologic Technologies Inc).

Portanto, uma possível aplicação biotecnológica da moojenactivase estaria, inicialmente, relacionada a capacidade de formação de FXa a partir de fator X como demonstrado no presente trabalho. No entanto, outras aplicações ainda podem ser desenvolvias a partir da protease.

### 5.3.4 Atividade fibrinogenolítica

O fibrinogênio, fator I da cascata de coagulação, é uma glicoproteína plasmática dimérica de 340 kDa composta por três cadeia α, β e γ (monômero). A clivagem na região N-terminal das cadeias α e β pela trombina promove a liberação dos Fibrinopeptídeos A e B, respectivamente, formando o monômero de fibrina que quando polimerizado, forma a rede de fibrina (Li et al., 1996).

Com o objetivo de avaliar uma possível ação proteolítica sobre o fibrinogênio, o fator I foi incubado com moojenactivase e os produtos da reação analisados por SDS-PAGE (Fig. 28). A protease foi capaz de clivar preferencialmente a cadeia α, em seguida a cadeia β do fibrinogênio. Mesmo após 240 minutos de reação, a protease não foi capaz de clivar a cadeia γ do fibrinogênio (Fig. 28). Outras

metaloproteases ativadoras de fator X e protrombina também apresentam a capacidade de clivagem da molécula de fibrinogênio, como observado para a VAFXA-I e VAFXA-II (LEONARDI et al., 2008), VBFXAE-II (SAMEL et al., 2003), Insularinase A (MODESTO et al., 2005) Berythractivase (SILVA et al., 2003), Bothrojaractivase (isolada da peçonha de *Bothrops jararaca* – BERGER et al., 2008) e Cotiaractivase (isolada da peçonha de *Bothrops cotiara*). Essas enzimas, incluindo a moojenactivase, pertecem a classe das α-fibrinogenases por atuarem preferencialmente sobre a cadeia α do fibrinogênio.

Tendo em vista a capacidade de clivagem da molécula de fibrinogênio, a eficácia da ação proteolítica da protease sobre o fator I foi avaliada com relação à capacidade de formação do coágulo de fibrina. Diferentemente da trombina humana, a protease não foi capaz de induzir a formação da rede de fibrina quando incubada com solução de fibrinogênio (Tabela IV). Outros ativadores como a Basparina A, Insularinase A e Bothrojaractivase também não foram capazes de induzir a formação do coágulo de fibrina a partir do fibrinogênio (LORÍA et al.,2003; MODESTO et al., 2005; BERGER et al., 2008). Esses resultados mostram que a moojenactivase, assim como outras metaloproteases, não apresentam atividade trombin-like (isto é, não atuam diretamente ativando o fibrinogênio como a trombina), não sendo capazes de ativar o fibrinogênio e, assim, não formando a rede de fibrina.

### 5.3.5 Moojenactivase induz atividade pró coagulante sobre plasma humano

Moojenactivase foi capaz de induzir a coagulação do plasma pobre em plaqueta (PPP) humano normal e PPP humano deficiente em fator X, apresentando dose coagulante mínima (DCM - concentração capaz de induzir a formação de coágulo em 60 segundos) de 3,93 µg/mL e 1,02 µg/mL, respectivamente (Fig. 29A e B). A capacidade pró coagulante sobre plasma humano também é observada a outros ativadores de protrombina como a Basparina A, Insularinase A e Bothrojaractivase (LORÍA *et al.*, 2003; MODESTO *et al.*, 2005; BERGER et al., 2008) e ativadore de fator X como FIa, VBFXAE-II, VLFXA, VAFXA-I e VAFXA-II (SIIGUR et al., 2001a; SAMEL et al., 2003; LEONARDI et al., 2008; SUN et al., 2010; KUMAR *et al.*, 2010). Dentre os ativadores citados, a Basparina A apresenta uma DCM de 0,2 µg/mL (LORÍA *et al.*, 2003) e a insularinase A uma DCM 6,79 µg/mL (MODESTO *et al.*, 2005).

Uma vez que a moojenactivase induz a ativação tanto do fator X quanto da protrombina, sendo que a ação sobre o fator X apresenta maior eficiência enzimática, podemos inferir que a capacidade da protease em induzir a coagulação do PPP deficiente em fator X com uma DCM menor (1,02 µg/mL) que aquela necessária para coagulação do PPP normal (3,93 µg/mL), pode ser devido à ausência do fator no plasma deficiente, fazendo com que a atividade enzimática da moojenactivase seja direcionada preferencialmente para o substrato protrombina que está presente. A Trimarin, um ativador de protrombina isolado da peçonha da serpente de *Trimeressurus malabaricus*, também é capaz de induzir a coagulação do plasma deficiente em fator X em concentrações menores da protease, quando comparada a ação coagulante sobre plasma normal (KUMAR *et al*., 2010).

Levando em consideração esses resultados e associados aos dados de atividade fibrinogenolítica, podemos afirmar que a moojenactivase é uma metaloprotease pró coagulante, por induzir a formação da rede de fibrina no plasma pela ativação dos fatores de coagulação X e protrombina, levando a formação dos produtos ativos fator Xa e, consequentemente, trombina, sendo a última responsável pela formação da rede de fibrina.

### 5.3.6 moojenactivase não induz fibrinólise direta

O processo de fibrinólise é responsável pela dissolução do coágulo de fibrina formado em excesso, sendo fundamental para a volta da fluidez do sangue no local de reparo tecidual (LIND et al., 2003). A plasmina, protease responsável pela lise da rede de fibrina, é a forma ativa do zimogênio plasminogênio, que está ligado internamente à rede de fibrina. O ativador tecidual do plasminogênio (TPA – do inglês *tecidual plasminogen activator*), liberado pelo endotélio da área da lesão, é responsável pela formação da plasmina a partir do plasminogênio, desencadeando o processo de fibrinólise, que limita a progressão desnecessária da trombose (ROBERTS et al., 2006).

Como forma de avaliar a ação direta da moojenactivase sobre a fibrinólise, o experimento de atividade fibrinolítica em meio contendo fibrina polimerizada foi realizado. A protease não foi capaz de induzir atividade fibrinolítica, não sendo observada a formação de halo de degradação de fibrina na placa, como foi observada para o controle Plasmina (Fig. 30). Diferentemente, alguns ativadores de protrombina, Insulanirase-A e Bothrojaractivase, foram capazes de induzir a

degradação da rede de fibrina através da clivagem inespecífica e geração de fragmentos diversos (SILVA *et al.*, 2003; MODESTO *et al.*, 2005; BERGER *et al.*, 2008). Já outros ativadores de protrombina e fator X não apresentam essa capacidade como a VBFXAE-II e a Berythractivase (SAMEL et al., 2003; SILVA et al., 2003).

Tendo em vista os resultados da atividade fibrinolítica observados (Fig. 30), e associado ao dado de que a moojenactivase não é capaz de ativar o plasminogênio (Tabela IV), pode-se inferir que a moojenactivase não participa diretamente (pela degradação da rede de fibrina) ou indiretamente (pela ativação de plasminogênio) do processo de fibrinólise.

### 5.3.7 Indução da agregação plaquetária pela moojenactivase

O processo de agregação plaquetária está relacionado a hemostasia primária, que é responsável por estancar o sangramento inicialmente pela formação do tampão ou trombo plaquetário. O processo de ativação das plaquetas ocorre inicialmente por sua interação com proteoglicanas presentes na camada subendotelial, como fibras colágenas e fator de vonWillebrand expostos devido a lesão endotelial, levando a desgranulação de grânulos citoplasmáticos e, liberando serotonina, tromboxano $A_2$ e o ADP (adenosina-difosfato) armazenados. Essas substâncias, dentre outras envolvidas no processo de coagulação como a trombina, são responsáveis pela propagação da ativação de outras plaquetas no local, induzindo o processo de agregação entre essas, e formando o tampão plaquetário (LIND et al., 2003).

A moojenactivase apresentou a capacidade de induzir a agregação plaquetária, sendo essa inibida na presença de EDTA (Fig. 31). Ainda, a incubação prévia da protease na presença de protrombina foi capaz de ampliar a resposta de agregação, indicando que a protease atua não apenas diretamente no processo de agregação, mas também indiretamente pela formação de produtos da ativação dos fatores, como a trombina.

Na literatura científica, relatos do envolvimento de metaloproteases no processo de agregação plaquetária citam a capacidade de indução ou inibição do processo (ANDREWS et al., 2001; LORÍA et al., 2003; HOWES et al., 2005; LEONARDI et al., 2008). Dentre aquelas capazes de induzir a agregação de plaquetas, podemos citar a Alborhagina, isolada da peçonha de *Trimeresurus*

*albolaris*, a qual apresenta-se como um agonista da agregação pela interação com a integrina αIIbβ3 e glicoproteína VI (GPVI) (ANDREWS et al., 2001). Ainda, segundo Wijeyewickremaas e colaboradores (2007), as metaloproteases Crotarhagina (*Crotalus horridus*) e Alborhagina (*Trimeresurus albolaris*) induzem agregação plaquetária pela interação com o GPVI, induzindo um processo por *shedding*, o qual envolve a ativação de uma metaloprotease endógena presente na plaqueta, e a consequente indução da agregação. Outra metaloprotease é a $E_0$VMP3, isolada da peçonha de *Echis ocellatus*, induz agregação de plaquetas humanas lavadas (HOWES et al., 2005).

A inibição de grande parte da atividade da moojenactivase de agregação de plaquetas pela incubação prévia com EDTA sugere não apenas o envolvimento do domínio metaloprotease, mas também o envolvimento do domínio lectina-like, uma vez que essa classe de toxinas é cálcio dependente (EBLE & ARLINGHAUS, 2012). A molécula de moojenactivase apresenta diferentes domínios que podem atuar sobre o processo de agregação plaquetária como o domínio desintegrina-like, metaloprotease e lectina-like. Como já descritos em literatura, esses domínios isoladamente, isto é quando não conjugados à molécula de metaloprotease, são descritos por obter uma ação de inibição da agregação (para o caso das desintegrinas-like - SELISTRE-de-ARAUJO, et al., 2005; Wijeyewickrema et al., 2005 - e algumas lectinas-like - NAVDAEV et al., 2001), ou pro agregante como outras lectinas-like (FUKUDA et al., 2002; LEE et al., 2003) (ver ítem 1.5.1.1.). Assim, metaloproteases das classes PIII e PIIId são descritas por modularem diferentemente a função plaquetária devido o envolvimento dos diferentes domínios (metaloprotease, desintegrina-like e lectina-like). As metaloproteases PIIId ativadoras de fator X RVVV-X (TAKEYA et al., 1992) e VAFXA-I e VAFXA-II (LEONARDI et al., 2008) são capazes de inibir a agregação plaquetária, possivelmente devido ao domínio desintegrina como sugerido pelos autores. Já as metaloproteases $E_0$VMP3 e Alborhagina, citadas acima, fazem parte das metaloproteases da classe PIII, as quais apresentam o domínio lectina-like, e apresentam capacidade de indução da agregação plaquetária (ANDREWS et al., 2001; HOWES et al., 2005). Esses dados indicam que a modulação da resposta sobre plaquetas pelos domínios presentes nas moléculas de metaloproteases são distintas, uma vez respeitando o caráter funcional de cada um dos domínios e sua capacidade de interação funcional aos outros domínios.

### 5.3.8 moojenactivase induz efeitos pró coagulantes pela estimulação de PBMC: produção de TNF-α e Fator Tecidual

Fator Tecidual (Fator III da cascata de coagulação) é uma glicoproteína transmembrana, no qual o domínio extracelular interage com o Fator VIIa da cascata de coagualção, formando o complexo Fator III/Fator VIIa, capaz de desencadear a coagulação sanguínea a partir da ativação do fator X e IX (ROBERTS et al., 2006). Em condições fisiológicas, o FIII é expresso constitutivamente na superfície de células subendoteliais, como células da musculatura lisa vascular, fibroblastos adventícios e pericitos (BUTENAS, 2012). No entanto, diversas células na circulação, como células endoteliais, monócitos e plaquetas, são capazes de expressar o FIII a partir de diferentes estímulos, como estímulos próinflamatórios (induzidos por endotoxinas como LPS e citocinas pró inflamatórias como TNF-α) e oxidativos (pela atuação da proteína dissulfeto isomerase). Esses estímulos não apenas induzem a expressão do fator tecidual na superfície dessas células, como também induzem a ativação do fator tecidual constitutivo. Essa ativação, ou descriptografado (do inglês *decrypted* - o termo na literatura científica internacional), está relacionada com a indução da formação de uma ponte dissulfeto entre os resíduos $Cys^{186}$-$Cys^{209}$ no domínio extracelular do Fator III conduzindo a uma mudança conformacional na molécula, o que permite a interação com o fator VIIa para dar início ao processo de coagulação. Ainda, o fator tecidual pode ser encontrado na forma livre, solúvel em plasma ou na forma de microvesículas (CHU, 2011).

Tendo em vista a participação do fator III no processo de coagulação, avaliamos o papel da moojenactivase na estimulação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e a expressão do fator III por esses leucócitos. Inicialmente observamos que os PBMC tratados com diferentes concentrações da moojenactivase (concentrações que não apresentaram indução de morte celular – Fig. 32A) apresentaram uma redução no tempo de coagulação plasmática, de maneira dose-dependente, quando comparado aos PBMC não tratados (Fig. 32B). O mesmo padrão de resposta também foi observado para o tratamento com LPS (Fig. 32B). Quando analisada a concentração de fator III do lisado celular, observamos que os PBMC tratados com moojenactivase apresentaram concentrações aumentadas do FIII, de maneira dose-dependente, assim como também os PBMC

tratados com LPS. Ainda, foi observada a produção da citocina pro inflamatória TNF-α no sobrenadante de PBMC tratado com moojenactivase e LPS. Já a incubação prévia da protease com EDTA ou aquecimento à 100ºC, inibiu o caráter estimulatório dos PBMC o qual voltaram a apresentar valores de coagulação e produção de TNF-α similares ao controle.

O LPS é um conhecido agente pro inflamatório que atua sobre receptores de reconhecimento de patógenos presentes nos leucócitos, como o receptor Toll-like-4, o qual induz a sinalização intracelular via o complexo proteico NFκB, induzindo a transcrição de citocinas pro inflamatória como TNF-α e IL-6. Sabe-se que TNF-α é capaz de induzir a expressão do fator tecidual em plaquetas, monócitos e células endoteliais, atuando como agentes de indução do processo de coagulação em eventos inflamatórios locais ou sistêmicos (CHU, 2011).

Levando em consideração os dados na literatura e os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que a moojenactivase é capaz de estimular PBMC e induzir um processo pro inflamatório por essas células. O processo pode estar relacionado também à expressão do fator tecidual na superfície desses leucócitos, na forma ativa (*decrypted*), sendo capaz de induzir o processo de coagulação. Essa atividade é inerente à protease uma vez que o inibidor funcional EDTA foi capaz de reverter o potencial estimulatório da moojenactivase, e o aquecimento à 100º C, o qual inativa a protease mas não possíveis contaminantes na amostra como LPS, também foi capaz de inibir a ação estimulatória da protease.

Os receptores PAR (do inglês *Protease Activated receptor*), família composta por 4 subtipos, são receptores ligados a proteína-G os quais são ativados pela clivagem de um segmento na porção N-terminal do domínio extracelular do receptor por proteases. Este receptor é expresso em diferentes células, principalmente leucócitos circulantes e céulas endoteliais (MACFARLANE et al., 2001; SOH et al., 2010). A estimulação de receptores PAR por proteases fisiológicas como trombina e fator Xa, podem levar a expressão de mediadores inflamatórios, moléculas de adesão celular e fator tecidual (MACFARLANE et al., 2001). Levando em consideração esses dados, a estimulação de PBMC pela moojenactivase e a inibição por EDTA indicam que a protease pode ser capaz de induzir um processo inflamatório pela ação proteolítica da molécula sobre determinados receptores como receptores PAR. Ainda, a indução da formação de trombina e fator Xa pela moojenactivase, a partir de protrombina e fator X respectivamente, podem levar a

estimulação leucocitária em cadeia. Sendo assim, os resultados obtidos nos levam a crer que a expressão do fator tecidual pela moojenactivase ocorre pela indução de um processo pro inflamatório, possivelmente pela estimulação de receptores PAR de maneira direta ou indireta (pela ação de trombina ou fator Xa gerado).

Dados na literatura a respeito da expressão de fator tecidual por peçonhas ou componente isolados das peçonhas, são escassos. Recentemente, Yamashita e colaboradores (2014) após a administração da peçonha bruta de *Bothrops jararaca* em ratos, observaram a presença aumentada de fator tecidual no plasma até 6 horas após a administração da peçonha, porém não sendo observado aumento da expressão no tecido cutâneo, no local da administração, ou tecido pulmonar. Esses reultados indicam a participação de células da circulação, como monócitos ou plaquetas, no processo de expressão do F III. Interessantemente, a incubação prévia da peçonha com EDTA, mas não com o inibidor de serino protease AEBSF ( *do inglês* 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), induziu uma drástica redução das concentrações plasmáticas de FIII, indicando que os principais responsáveis pela estimulação e consequente expressão do fator tecidual são as metaloproteases presentes na peçonha de *Bothrops jararaca* (YAMASHITA et al., 2014).

## 5.4 Caracterização Funcional *in vivo*

### 5.4.1 moojenactivase não induz hemorragia local

A moojenactivase não foi capaz de induzir o processo hemorrágico local nos camundongos administrados s.c. com a protease, diferentemente da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* (Fig. 34). Dentre as metaloproteases ativadoras de fator X e protrombina descritas, os ativadores de fator X VAFXA-II e VAFXA-I (LEONARDI et al., 2008) e os ativadores de protrombina Basparina A (LORÍA et al., 2003), Insularinase A (MODESTO et al., 2005) também não apresentam essa atividade.

A ação hemorrágica local induzida por componentes da peçonha de serpentes é caracterizada pelo desempenho de proteases, principalmente metaloproteases, as quais são capazes de induzir uma ação proteolítica sobre componentes de membrana basal endotelial. A membrana basal é composta por componentes de matirz extracelular, que funcionam como moléculas de polimerização que unem todo o conteúdo extracelular tecidual, dos quais podemos

citar o colágeno, nidogênio, fibronectina, laminina, dentre outras (LU et al., 2005). Sendo assim, podemos inferir que a falta de capacidade a moojenactivase não apresenta a capacidade de degradação desses componentes proteicos.

### 5.4.2 moojenactivase induz alterações nos parâmetros hemostáticos e leucocitário

Dentre as manifestações fisiopatológicas nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*, as análises dos distúrbios de coagulação apresentam grande importância do ponto de vista tanto do prognóstico do paciente acometido quanto da eficiência da terapia com soroantiofídico. Dentre os parâmetros de análise laboratoriais, os pacientes envenenados apresentam elevado Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada, baixa concentração de fibrinogênio plasmático e redução da concentração de plaquetas sanguíneas. Esse quadro é manifestado por um estado de incoagulabilidade sanguínea devido à ativação dos fatores de coagulação e levando ao consumo do fibrinogênio (BARRAVIERA, 1994). Em experimentações animais, a administração de metaloproteases isoladas da peçonha de serpentes, que atuam sobre fatores de coagulação também são capazes de induzir o mesmo quadro de manifestações clínicas, relacionadas a distúrbios de hemostasia observada nos pacientes acidentados (LORÍA *et al.*, 2003; SUNTRAVAT *et al.*, 2011; YAMASHITA et al., 2014).

Tendo em vista os resultados obtidos dos experimentos *in vitro* relacionados à função da moojenactivase sobre a hemostasia (ativação dos fatore II e X, indução da agregação plaquetária e estimulação da expressão de fator III leucocitária), uma avaliação do envolvimento dessa metaloprotease sobre o sistema de coagulação em animais experimentais foi realizada, onde parâmetros hematológicos (série branca e série vermelha) e parâmetros hemostáticos forma avaliados.

Inicialmente, observamos que os parâmetros hematológicos relacionados a série vermelha das amostras de sangue dos animais tratados com moojenactivase não apresentam qualquer alteração significativa, indicando que protease não seja capaz de atuar de maneira que proporcione qualquer alteração nesses parâmetros hematológicos (Fig. 39).

Como observado no ensaio de tempo de sangramento em animais administrados com a moojenactivase, a capacidade da toxina de induzir um aumento

do tempo de sangramento indica a eficiência de promover alterações de função plaquetária e/ou da integridade funcional do vaso sanguíneo afetado (Fig. 35). Quando avaliado a contagem de plaquetas do material sanguíneo coletado, pôde-se observar uma significante diminuição do número de plaquetas circulantes (Fig. 37), mantendo-se reduzida até 3 horas após a administração. Esses dados corroboram com os resultados de ação pró agregante plaquetária *in vitro* pela moojenactivase, obtidos no presente trabalho, indicando uma ação direta da protease sobre as plaquetas ou uma atividade indireta por induzir a formação de trombina, a qual também é um agonista de agregação plaquetária (Fig. 31). Esses dados indicam um quadro de trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas na circulação) induzido pela moojenactivase. A RVV-X, uma metaloprotease ativadora de fator X da classe P-IIId isolada da peçonha de *Daboia russellii siamensis* (SUNTRAVAT *et al*., 2011), apresentou atividade bastante próxima à observada pela moojenactivase. A RVV-X também foi capaz de induzir um quadro de trombocitopenia em animais administrados com a toxina. Apesar dos resultados publicados por Takeya e colaboradores (1992) mostrarem que a toxina é capaz de inibir a agregação plaquetária, a RVV-X também é capaz de induzir a formação de trombina no meio (pela ativação de fator X e consequente ativação de protrombina), assim como a moojenactivase. Dessa forma, o quadro de trombocitopenia instaurado nos animais administrados com moojenactivase e RVV-X possivelmente está relacionado principalmente com a capacidade de ativação de fatores de coagulação.

Ainda, a avaliação dos parâmetros plasmáticos de hemostasia obtidos pelos ensaios de TP, TTPa e dosagem de fibrinogênio (Figura 38A, B e C), apresentaram valores de TP e TTPa prolongados, assim como a concentração de fibrinogênio reduzidas até 3 horas após a administração (Fig. 38), sendo o TP mantendo-se aumentado até 6 horas (Fig. 38B). Esses dados indicam alterações nos componentes das vias intrínseca e extrínseca de coagulação, mais especificamente sobre os fatores de coagulação. Uma vez que a partir dos dados experimentais *in vitro* da capacidade da moojenactivase em ativar os fatores de coagulação X e protrombina, podemos inferir que o quadro de diminuição da coagulabilidade induzido pela protease é decorrente da ativação desses fatores e consequente consumo do fibrinogênio plasmático. Assim como a moojenactivase, RVV-X também foi capaz de alterar os tempos de sangramento de ratos administrados com a protease, assim como também foi capaz de aumentar os tempos de coagulação

plasmática (SUNTRAVAT et a., 2011). De maneira semelhante, a peçonha bruta de *Bothrops jararaca* também foi capaz de induzir alterações na coagulação, onde o TP de animais administrados com a peçonha apresentou-se prolongado até 6 horas após a administração, assim como a concentração de fibrinogênio reduzida. Estes valores foram significantemente revertidos pela incubação da peçonha com EDTA, mas não com inibidor de serinoprotease, indicando que as metaloproteases da peçonha são as principais responsáveis pela ação sobre componentes de coagulação plasmática. A Basparina A, uma metaloprotease ativadora de protrombina isolada da peçonha de *Bothrops asper*, foi capaz de induzir um quadro de incoagulabilidade sanguínea em camundongos administrados i.v. e i.p. com 1 µg da protease mantendo-se elevada até 5 horas após a administração, indicando um efeito de defibrinogenação (LORÌA et al., 2003).

A análise dos parâmetros hematológicos relacionados à série branca (Fig. 36A, B e C), mostram que a contagem de leucócitos totais encontra-se aumentada na corrente sanguínea até 3 horas após a administração da protease (Fig. 36A). Ainda, observa-se um aumento nos níveis de neutrófilos até 3 horas após o desafio (Fig. 36B), sendo os leucócitos mononucleares aumentados apenas após 1 hora (Fig. 36C). Esses dados indicam que a moojenactivase é capaz de induzir um processo pro inflamatório de caráter agudo, corroborando com os dados obtidos da estimulação de PBMC tratados com a protease que mostram um aumento na expressão da citocina pró inflamatória TNF-α.

O caráter inflamatório das metaloproteases isoladas das peçonhas de serpentes têm sido amplamente estudado (FARSKY et al., 2000; SILVA et al., 2003; GALLAGHER et al., 2005; FERNANDES et al., 2006; LOPES et al., 2009; PEICHOTO et al., 2011; LOPES et al., 2012), sendo os dados apresentados relacionados a ensaios *in vitro* e *in vivo*. Dentre os resultados citados, podemos mencionar: Jararhagina, uma metaloprotease da classe PIII isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, induz a estimulação de células endoteliais e a expressão de citocinas pro inflamatórias, assim como moléculas de adesão relacionados ao processo de migração celular (LOPES et al., 2012); Neuwiedase, uma metaloprotease da classe PI isolada da peçonha de *Bothrops neuwiedi*, induz miotoxicidade em musculatura esquelética estriadas em camundongos caracterizado pelo infiltrado de polimorfonucleares e mediadores inflamatórios no local; a BaP1, uma metaloprotease da classe PI isolada da peçonha de *Bothrops asper*, induziu

migração leucocitária em cavidade peritoneal, assim como a expressão de citocinas pró inflamatórias e moléculas de adesão celular. A Berythractivase, metaloprotease da classe PIII e ativadora de protrombina isolada da peçonha de *Bothrops erythromelas*, induz a estimulação pró inflamatória de células endoteliais e expressão de moléculas de adesão.

Levando em consideração os resultados obtidos a respeito do processo inflamatório induzido pela moojenactivase, e os dados da literatura, podemos inferir que a protease é capaz de induzir a estimulação de leucócitos circulantes, com o envolvimento de mediadores inflamatórios na resposta, onde este comportamento está relacionado à uma ação direta da protease sobre os leucócitos, ou pela ação dos produtos da ativação de fatores da coagulação (trombina e fator Xa), que também apresentam função no processo inflamatório.

## 6 CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados obtidos no presente trabalho referentes à purificação e caracterização bioquímica e funcional *in vitro* e *in vivo* da moojenactivase, podemos concluir:

√ A moojenactivase, isolada a partir da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* pela associação de procedimentos cromatográficos (exclusão molecular, interação hidrofóbica e troca aniônica), apresenta massa molecular de aproximadamente 89 kDa, sendo composta por 3 cadeias ligadas por pontes dissulfeto (CP de ~66 kDa contendo os domínios metaloprotease e desintegrina-like, e as CL β de ~17 kDa e CL α de ~14 kD correspondendo ao heterodímero de lectina-like) pertencendo à classe PIIId das metaloproteases.

√ A protease possui sítio(s) de N-glicosilação na cadeia pesada da molécula, sendo o conteúdo de carboidrato correspondendo à cerca de 20 % da massa da CP, além de apresentar pI de 4,92;

√ A protease apresenta diminuição da atividade de ativação de protrombina quando previamente incubada em condições de pH 3,5 – 5,0 e em pH 9,0, assim como quando incubada na presença de íons $Cu^{2+}$ (5 mM), EDTA (5 mM), SDS (10 mM), DTT (10 mM) e soro anti ofídico anti botrópico/crotálico (1:20 m/m);

√ A metaloprotease foi capaz de ativar o fator de coagulação protrombina (fator II), clivando entre os resíduos $Arg^{320}$-$Ile^{321}$ e formando α-trombina (atividade específica 22,56 nmols trombina. $min^{-1}.mg^{-1}$), além de ser capaz de ativar o fator X da coagulação, clivando entre os resíduos $Arg^{194}$-$Ile^{195}$ e formando o fator X ativado (atividade específica 116,34 nmols Fator Xa. $min^{-1}.mg^{-1}$).

√ A moojenactivase induziu a clivagem das cadeias α e β do fibrinogênio (fator I), mas não a cadeia γ, porém não foi capaz de induzir a formação do coágulo de solução de fibrinogênio;

√ A moojenactivase apresenta função pró coagulante sendo capaz de induzir a coagulação de plasma humano normal e deficiente em fator X, apresentado dose mínima coagulante de 3,93 e 1,02 µg/mL; somado aos resultados obtidos da ativação dos fatores I, II e X, concluímos também que a ação pró coagulante é referente a ativação dos fatores X e II.

√ A protease não foi capaz de induzir a atividade fibrinolítica e também não foi capaz de ativar o plasminogênio, indicando não participar diretamente ou indiretamente do processo de fibrinólise;

√ A protease foi capaz de induzir a agregação de plaquetas diretamente, e indiretamente pela formação de trombina a partir da incubação prévia da metaloprotease com protrombina;

√ A protease não apresentou atividade hemorrágica em camundongos administrados com a metaloprotease;

√ A moojenactivase foi capaz de estimular um processo proinflamatório em pBMC tratados com a protease, avalidos pela produção da citocina TNF-α, além de induzir a expressão de fator tecidual (Fator III da coagulação) o qual conferiu um caráter pró coagulante ao PBMC;

√ Quando administrada i.v. em ratos, a metaloprotease foi capaz de prolongar o tempo de sangramento, além de apresentar valores de contagem de plaquetas no sangue total desses animais reduzido;

√ Ainda, o plasma dos animais administrados com a protease (3 µg/Kg) apresentaram valores de coagulação, nos ensaios de TP e TTPa, elevados, além da diminuição da concentração de fibrinogênio, indicando um quadro de ativação dos fatores paslmáticos e consequente consumo do fibrinogênio;

√ A avaliação dos parâmetros hematológicos da série branca do sangue total dos animais administrados com a protease indicaram um processo inflamatório pelo aumento leucocitário circulante, composto principalmente por neutrófilos;

√ A avaliação dos parâmetros da série vermelha indicam que a protease não é capaz de induzir alterações em células eritrocitárias.

Sendo assim, podemos concluir que a moojenactivase participa no processo fisiopatológico do envenenamento pela peçonha de *Bothrops moojeni* pela ação pró coagulante, devido à ativação dos fatores II e X da cascata de coagulação, pela ação de indução de agregação plaquetária de maneira direta e indireta, além da estimulação proinflamatória de leucócitos da circulação sanguínea e consequente expressão do fator III com atividade pró coagulante. Esses efeitos levam a alterações hematológicas, como observado a partir dos resultados da experimentação *in vivo*, relacionados a distúrbios envolvendo o sistema de coagulação e processo inflamatório. Assim, os presentes resultados fornecem informações importantes para o entendimento da função das proteases com capacidade de ativação de fatores de coagulação nos distúrbios de coagulação como observado nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*.

## 7 REFERÊNCIAS

ALTIERI, D. C.; EDGINGTON, T. S. Identification of effector cell protease receptor-1. A leukocyte-distributed receptor for the serine protease factor Xa. J Immunol, v. 145, n. 1, p. 246-53, 1990.

AMARAL, C. F. et al. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. Toxicon, v. 23, n. 6, p. 877-85, 1985.

ANDREWS, R. K. et al. A novel viper venom metalloproteinase, alborhagin, is an agonist at the platelet collagen receptor GPVI. J Biol Chem, v. 276, n. 30, p. 28092-7, 2001.

ARANTES, E. C. et al. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. Toxicon, v. 27, n. 8, p. 907-16, 1989.

ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. Toxicon, v. 60, n. 4, p. 512-9, 2012.

ATANASOV, V. N. et al. Hemolytic and anticoagulant study of the neurotoxin vipoxin and its components--basic phospholipase A2 and an acidic inhibitor. Biochemistry (Mosc), v. 74, n. 3, p. 276-80, 2009.

BARRAVIERA, B., PEREIRA, P.C.M. Acidentes por Serpentes do gênero Bothrops. p, 261 – 280. In. BARRAVIERA, B. Venenos Animais: uma visão integrada. Ed de Publicações Científicas, 1994.

BERGER, M.; PINTO, A. F.; GUIMARÃES, J. A. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. Toxicon, v. 51, n. 4, p. 488-501, 2008.

BERNARDES, C. P. et al. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. Toxicon, v. 51, n. 4, p. 574-84, 2008.

BÉRNILS, R. S. & H. C. COSTA (org.). 2011. Brazilian reptiles – List of species. Acessível no site http://www.sbherpetologia.org.br/. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Dados obtidos em consulta no dia 12 de Agosto de 2012.

BLAYA, C. et al. [Use of new thrombin inhibitors in medical practice]. Arq Bras Cardiol, v. 71, n. 2, p. 163-7, 1998.

BORGES, A.; TSUSHIMA, R. G.; BACKX, P. H. Antibodies against *Tityus discrepans* venom do not abolish the effect of *Tityus serrulatus* venom on the rat sodium and potassium channels. Toxicon, v. 37, n. 6, p. 867-81, 1999.

BORN, G. V.; CROSS, M. J. THE AGGREGATION OF BLOOD PLATELETS. J Physiol, v. 168, p. 178-95, 1963.

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. 248-54, 1976.

BUTENAS, S. Tissue factor structure and function. Scientifica (Cairo), v. 2012, p. 964862, 2012.

CALVETE, J. J. The continuing saga of snake venom disintegrins. Toxicon, v. 62, p. 40-9, 2013.

CAMPBELL, J.A., LAMAR, W.W. Taxonomic status of miscellaneous *Neotropical viperids*, with the description of a new genus. Occasional. Papers of the Museum of Texas Tech University, v. 153: p. 1–31, 1992.

CARDOSO, J. L. C. Snakebites at hospital Vital Brazil. A study of 2908 cases. Toxicon, v. 23, p. 558- 562, 1985.

CARDOSO, J.L.C. Ofídios – *Bothrops* (jararaca, cruzeira). In: NICOLELA, A., BARROS, E., TORRES J.B. Acidentes com animais peçonhentos – Consulta rápida. Ministério da Saúde, p. 47, 1997.

CARDOSO, J.L.C., de SIQUEIRA FRANÇA, F.Q., WEN, F.H., MALÁQUE, C.M.S., HADDAD, Jr. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Ed. SARVIER, São Paulo, 2003.

CHU, A. J. Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview. Int J Inflam, v. 2011, p. 367284, 2011.

COLMAN, R.W., MARDER, V.J., SALZMAN, E.W., HIRSH, J. Overview of hemostasis. In. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical pratices. COLMAN, R.W., MARDER, V.J., SALZMAN, E.W., HIRSH, J. J.B. Linppincott Company. Terceira edição, Filadélfia, p. 3-18.

DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. Lancet, v. 355, n. 9215, p. 1627-32, 2000.

DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. Biochemistry, v. 30, n. 43, p. 10363-70, 1991.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science, v. 145, n. 3638, p. 1310-2, 1964.

DE MORAIS, N. C. et al. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. Toxicon, v. 60, n. 7, p. 1251-8, 2012.

DE SOUZA, A. H. et al. An evaluation of the antinociceptive effects of Phα1β, a neurotoxin from the spider Phoneutria nigriventer, and ω-conotoxin MVIIA, a cone snail Conus magus toxin, in rat model of inflammatory and neuropathic pain. Cell Mol Neurobiol, v. 33, n. 1, p. 59-67, 2013.

DEMLER, C. et al. Platelet-active substances in the venom of Bothrops moojeni snake-a novel evaluation method using whole blood aggregometry. Platelets, v. 21, n. 1, p. 20-8, 2010.

DISCIPIO, R. G.; DAVIE, E. W. Characterization of protein S, a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine and human plasma. Biochemistry, v. 18, n. 5, p. 899-904, 1979.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. Toxicon, v. 40, n. 6, p. 659-65, 2002.

ESCALANTE, T. et al. Bothrops asper metalloproteinase BaP1 is inhibited by alpha(2)-macroglobulin and mouse serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy. Toxicon, v. 43, n. 2, p. 213-7, 2004.

ESNOUF, M. P.; WILLIAMS, W. J. The isolation and purification of a bovine-plasma protein which is a substrate for the coagulant fraction of Russell's-viper venom. Biochem J, v. 84, p. 62-71, 1962.

FARSKY, S. H. et al. Bothrops asper snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. Mediators Inflamm, v. 9, n. 5, p. 213-21, 2000.

FENWICK, A.M., GUBERLET, J.R., EVANS, J.A., PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis, and Bothrocophias (Serpentes: Viperidae). Zoological Journal of the Linnean Society, vol 156, p. 617-640, 2009.

FERNANDES, C. M. et al. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from Bothrops asper snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. Toxicon, v. 47, n. 5, p. 549-59, 2006.

FERREIRA, CN; SOUSA, MO; DUSSE, LMS; CARVALHO, MG. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. Rev. Bras. Hematol e Hemotoreapia. v. 32; p-416-421, 2010.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. FEBS J, v. 275, n. 12, p. 3016-30, 2008.

FRANÇA F.O.S., MÁLAQUE C.M.S. Acidente botrópico, p.72-86. In: Cardoso J.L.C., França F.O.S., Wen F.H., Málque C.M.S & Haddad Jr V. (ed.) Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier Editora, São Paulo. 2003.

FURIE, B.; FURIE, B. C. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. Blood, v. 75, n. 9, p. 1753-62, 1990.

FURIE, B.; FURIE, B.C. Molecular and cellular biology of blood coagulation. N Engl J Med, v. 326, n. 12, p. 800-6, 1992.

GAILANI, D.; BROZE, G. J. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. Science, v. 253, n. 5022, p. 909-12, 1991.

GALLAGHER, P. et al. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: in vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. Arch Biochem Biophys, v. 441, n. 1, p. 1-15, 2005.

GARCÍA-MANZANO, A. et al. Standardization of rat blood clotting tests with reagents used for humans. Proc West Pharmacol Soc, v. 44, p. 153-5, 2001.

GASIC, G. P. et al. Coagulation factors X, Xa, and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 89, n. 6, p. 2317-20, Mar 1992. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1532256 >.

GEMPELER-MESSINA, P. M. et al. Protein C activators from snake venoms and their diagnostic use. Haemostasis, v. 31, n. 3-6, p. 266-72, 2001 May-Dec 2001. ISSN 0301-0147. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910194 >.

GENTRY, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. Vet J, v. 168, n. 3, p. 238-51, Nov 2004. ISSN 1090-0233. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih. gov/pubmed/15501141 >.

GOMES, M. S. et al. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops moojeni snake venom. Toxicon, v. 53, n. 1, p. 24-32, 2009.

GORNITSKAIA, O. V.; PLATONOVA, T. N. [Isolation and properties of the protein C activator from Agkistrodon halys halys venom]. Biomed Khim, v. 49, n. 5, p. 470-8, 2003.

GOVERS-RIEMSLAG, J. W. et al. Structural and functional characterization of a prothrombin activator from the venom of Bothrops neuwiedi. Biochim Biophys Acta, v. 916, n. 3, p. 388-401, 1987.

GOWDA, D. C. et al. Core sugar residues of the N-linked oligosaccharides of Russell's viper venom factor X-activator maintain functionally active polypeptide structure. Biochemistry, v. 35, n. 18, p. 5833-7, 1996.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie, v. 82, n. 9-10, p. 841-50, 2000.

GUÉRCIO, R. A. et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake Bothrops atrox. Proteome Sci, v. 4, p. 11, 2006.

HATI, R. et al. Snake venom hemorrhagins. Crit Rev Toxicol, v. 29, n. 1, p. 1-19, 1999.

HIGAKI, J. N. et al. Regulation of serine protease activity by an engineered metal switch. Biochemistry, v. 29, n. 37, p. 8582-6, 1990.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. The action of high-dose factor VIIa (FVIIa) in a cell-based model of hemostasis. Semin Hematol, v. 38, n. 4 Suppl 12, p. 6-9, 2001.

HOFMANN, H.; BON, C. Blood coagulation induced by the venom of Bothrops atrox. 1. Identification, purification, and properties of a prothrombin activator. Biochemistry, v. 26, n. 3, p. 772-80, 1987.

HOWES, J. M. et al. Effects of three novel metalloproteinases from the venom of the West African saw-scaled viper, Echis ocellatus on blood coagulation and platelets. Biochim Biophys Acta, v. 1724, n. 1-2, p. 194-202, 2005.

HUANG, M. Z.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Pathological changes induced by an acidic phospholipase A2 from Ophiophagus hannah venom on heart and skeletal muscle of mice after systemic injection. Toxicon, v. 34, n. 2, p. 201-11, 1996.

HUANG, M. Z.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R. M. Role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A2 from Ophiophagus hannah snake venom. Life Sci, v. 61, n. 22, p. 2211-7, 1997.

JIM, J.; SAKATE, M. Aspectos biológicos dos animais peçonhentos – Biologia das serpentes. In: BARRAVIERA, B. Venenos animais. Rio de Janeiro: EPUC, cap. 9, p. 109-34, 1994.

KALAFATIS, M.; BECK, D. O.; MANN, K. G. Structural requirements for expression of factor Va activity. J Biol Chem, v. 278, n. 35, p. 33550-61, 2003.

KAMIGUTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. Toxicon, v. 45, n. 8, p. 1041-9, 2005.

KAMIGUTI, A. S. et al. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in Bothrops jararaca envenoming. Butantan Institute Antivenom Study Group. Thromb Haemost, v. 67, n. 4, p. 484-8, 1992.

KARLSTRÖM, A. R.; LEVINE, R. L. Copper inhibits the protease from human immunodeficiency virus 1 by both cysteine-dependent and cysteine-independent mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 88, n. 13, p. 5552-6, 1991.

KINI, R. M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. Pathophysiol Haemost Thromb, v. 34, n. 4-5, p. 200-4, 2005.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. Biochem J, v. 397, n. 3, p. 377-87, 2006.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. Toxicon, v. 28, n. 12, p. 1387-422, 1990.

KINI, R. M.; RAO, V. S.; JOSEPH, J. S. Procoagulant proteins from snake venoms. Haemostasis, v. 31, n. 3-6, p. 218-24, 2001.

KINI, R.M., MORITA, T., ROSING, J. Classification and nomenclature of prothrombin activators isolated from snake venoms. Thromb Haemost. v. 86, p. 710-711, 2001.

KIRCHHOFER, D.; NEMERSON, Y. Initiation of blood coagulation: the tissue factor/factor VIIa complex. Curr Opin Biotechnol, v. 7, n. 4, p. 386-91, 1996.

KOUYOUMDJIAN, J.A., KOUYOUMDJIAN, N.C.V. Acidentes ofídicos: estudo de 46 casos na região de São José do Rio Preto. Ars Curandi. v. 19, p. 55-92, 1986.

KOUYOUMDJIAN, J.A ; POLIZELLI, C. Acidentes ofidicos causados por Bothrops moojeni: correlação do quadro clínico com o tamanho da serpente. Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo, v.31, n.2, p.84 – 90, 1989.

KOUYOUMDJIAN, J.A.E., POLIZELLI, C. Snake bites caused by Bothrops moojeni: reporte of 37 cases. Rev Inst Med trop. v. 30, p. 624-632, 1998.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C.; LOBO, S. M.; GUIMARÃES, S. M. Acidentes ofídicos causados por Bothrops moojeni na região de São José do Rio Preto – São Paulo. Arq. Bras. Med., v. 64, p. 167-171, 1990.

KUMAR, R. V. et al. Purification and characterization of 'Trimarin' a hemorrhagic metalloprotease with factor Xa-like Activity, from Trimeresurus malabaricus snake venom. Thromb Res, v. 126, n. 5, p. e356-64, 2010.

LEE, W. H. et al. Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from Trimeresurus stejnegeri venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI. Thromb Haemost, v. 90, n. 4, p. 662-71, 2003.

LEONARDI, A. et al. Two coagulation factor X activators from Vipera a. ammodytes venom with potential to treat patients with dysfunctional factors IXa or VIIa. Toxicon, v. 52, n. 5, p. 628-37, 2008.

LI, X.; GALANAKIS, D.; GABRIEL, D. A. Transient intermediates in the thrombin activation of fibrinogen. Evidence for only the desAA species. J Biol Chem, v. 271, n. 20, p. 11767-71, 1996.

LIND, S.E., MARKS, P.W., EWENSTEIN, B.M. Hemostatic system. In. Blood: principles and practice of hematology. HANDIN, R.I., LUX, S.E., STOSSEL, T.P. Lippincott Willians & Wilkins, segunda edição. Filadelfia, p. 959-981, 2003.

LOMONTE, B. et al. Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomics. J Proteomics, 2014.

LOPES, D. S. et al. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from Bothrops neuwiedi venom. Toxicon, v. 54, n. 1, p. 42-9, 2009.

LOPES, D. S. et al. Gene expression of inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. Toxicon, v. 60, n. 6, p. 1072-84, 2012.

LORÍA, G. D. et al. Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake Bothrops asper that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. Arch Biochem Biophys, v. 418, n. 1, p. 13-24, 2003.

LU, X. et al. Snake venom metalloproteinase containing a disintegrin-like domain, its structure-activity relationships at interacting with integrins. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, v. 3, n. 3, p. 249-60, 2005.

MACFARLANE, R. G. AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER. Nature, v. 202, p. 498-9, 1964.

MACFARLANE, S. R. et al. Proteinase-activated receptors. Pharmacol Rev, v. 53, n. 2, p. 245-82, 2001.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of Mikania glomerata. J Ethnopharmacol, v. 102, n. 3, p. 364-70, 2005.

MAGNUSSON, S., PETERSEN, T. E., SOTTRUP-JENSEN, L., CLAEYS, H. (). Complete Primary Structure of Prothrombin: Isolation, Structure and Reactivity of Ten Carboxylated Glutamic Acid Residues and Regulation of Prothrombin Activation by Thrombin, in Proteases and Biological Control (Reich, E., Rifkin, B. D., and Shaw, E. Eds.), p. 123-149, 1975.

MARANGONI, F. A. et al. Unmasking snake venom of Bothrops leucurus: purification and pharmacological and structural characterization of new PLA2 Bleu TX-III. Biomed Res Int, v. 2013, p. 941467, 2013.

MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. Toxicon, v. 62, p. 3-18, 2013.

MARUYAMA, M. et al. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by Bothrops jararaca (jararaca). Thromb Haemost, v. 63, n. 3, p. 449-53, 1990.

MATSUZAKA, T. et al. Relationship between vitamin K dependent coagulation factors and anticoagulants (protein C and protein S) in neonatal vitamin K deficiency. Arch Dis Child, v. 68, n. 3 Spec No, p. 297-302, 1993.

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 do Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Ed. SAVIER, p. 33-71, 2003.

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 do Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Ed. SAVIER, p. 42-70, 2009.

MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. E. P. et al. Isolation, functional, and partial biochemical characterization of galatrox, an acidic lectin from Bothrops atrox snake venom. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), v. 43, n. 3, p. 181-92, 2011.

MINISTÉRIO da SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6ed., p.320, 2005.

MIZUNO, H. et al. Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 98, n. 13, p. 7230-4, 2001.

MIZUNO, H. et al. Crystal structure of coagulation factor IX-binding protein from habu snake venom at 2.6 A: implication of central loop swapping based on deletion in the linker region. J Mol Biol, v. 289, n. 1, p. 103-12, 1999.

MODESTO, J. C. et al. Insularinase A, a prothrombin activator from Bothrops insularis venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. Biol Chem, v. 386, n. 6, p. 589-600, 2005.

MORITA, T. C-type lectin-related proteins from snake venoms. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, v. 4, n. 4, p. 357-73, 2004a.

MORITA, T. Use of snake venom inhibitors in studies of the function and tertiary structure of coagulation factors. Int J Hematol, v. 79, n. 2, p. 123-9, 2004b.

MOUNIER, C. M.; BON, C.; KINI, R. M. Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A(2): protein- versus phospholipid-dependent mechanism of action. Haemostasis, v. 31, n. 3-6, p. 279-87, 2001.

NADUR-ANDRADE, N. et al. Analgesic Effect of Light-Emitting Diode (LED) Therapy at Wavelengths of 635 and 945 nm on Bothrops moojeni Venom-Induced Hyperalgesia. Photochem Photobiol, 2013.

NAVDAEV, A. et al. Aggretin, a heterodimeric C-type lectin from Calloselasma rhodostoma (Malayan pit viper), stimulates platelets by binding to α2β1 integrin and glycoprotein Ib, activating Syk and phospholipase Cγ 2, but does not involve the glycoprotein VI/Fc receptor γ chain collagen receptor. J Biol Chem, v. 276, n. 24, p. 20882-9, 2001.

NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, Bothrops moojeni, in the Brazilian Cerrado. J. Herp., v. 37, p. 653-659, 2003.

OLIVEIRA, F. et al. Purification and partial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of Bothrops moojeni (CAISSACA). Biochem Mol Biol Int, v. 47, n. 6, p. 1069-77, 1999.

OLIVEIRA, F. N. et al. Another record of significant regional variation in toxicity of Tityus serrulatus venom in Brazil: a step towards understanding the possible role of sodium channel modulators. Toxicon, v. 73, p. 33-46, 2013.

PEICHOTO, M. E. et al. Inflammatory effects of patagonfibrase, a metalloproteinase from Philodryas patagoniensis (Patagonia Green Racer; Dipsadidae) venom. Exp Biol Med (Maywood), v. 236, n. 10, p. 1166-72, 2011.

PERCHUC, A. M. et al. Isolation and characterization of two new Lys49 PLA2s with heparin neutralizing properties from Bothrops moojeni snake venom. Toxicon, v. 55, n. 6, p. 1080-92, 2010.

PERCHUĆ, A. M. et al. The potential of Bothrops moojeni venom in the field of hemostasis. Established use and new insights. Pathophysiol Haemost Thromb, v. 34, n. 4-5, p. 241-5, 2005.

PETERSON, G.L. Determination of total protein. Methods in enzymology. v. 91, p.95-119, 1983.

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

POLGÁR, J. et al. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from Crotalus durissus terrificus (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. J Biol Chem, v. 272, n. 21, p. 13576-83, 1997.

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. Toxicon, v. 52, n. 8, p. 842-51, 2008.

RAO, V. S.; SWARUP, S.; KINI, R. M. The nonenzymatic subunit of pseutarin C, a prothrombin activator from eastern brown snake (Pseudonaja textilis) venom, shows structural similarity to mammalian coagulation factor V. Blood, v. 102, n. 4, p. 1347-54, 2003.

ROBERTS, H.R., MONROE, D.M., HOFFMAN, M. Molecular Biology and Biochemistry of the Coagulation Factors and Pathways of hemostasis. In: Willians Hematology. LINCHTAMN, M.A., BEUTLER, E., KIPPS, T.J., SELIGSOHN, U., KAUSHANSKY, K., PRCHAL, J.T. McGraw-Hill Medical. p.1665 – 1693, 2006.

RODRIGUES, V. M. et al. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from Bothrops neuwiedi snake venom. Arch Biochem Biophys, v. 381, n. 2, p. 213-24, 2000.

ROJAS, C.A., GONÇALVES, M.R., ALMEIDA-SANTOS, S..M. Epidemiologia dos acidentes ofídicos na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. Rev Bras Saúde Prod An. v. 8, p. 193-204, 2007.

ROSING, J. et al. Factor V activation and inactivation by venom proteases. Haemostasis, v. 31, n. 3-6, p. 241-6, 2001.

ROSING, J.; TANS, G. Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators. Toxicon, v. 30, n. 12, p. 1515-27, 1992.

RUCAVADO, A. et al. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by Bothrops asper snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa2EDTA. Am J Trop Med Hyg, v. 63, n. 5-6, p. 313-9, 2000.

RÜDIGER, H. et al. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. Curr Med Chem, v. 7, n. 4, p. 389-416, 2000.

SALVADOR, G. H. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of BmooPLA2-I, a platelet-aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from Bothrops moojeni venom. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, v. 67, n. Pt 8, p. 900-2, 2011.

SAMEL, M. et al. Metalloproteinase with factor X activating and fibrinogenolytic activities from Vipera berus berus venom. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, v. 135, n. 4, p. 575-82, 2003.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I2 inductor phospholipase A2 isolated from Bothrops moojeni snake venom. Toxicon, v. 52, n. 8, p. 908-17, 2008.

SCHAEFFER, R. C. et al. Disseminated intravascular coagulation following Echis carinatus venom in dogs: effects of a synthetic thrombin inhibitor. J Lab Clin Med, v. 107, n. 6, p. 488-97, 1986.

SELIGSOHN, U. Factor XI in haemostasis and thrombosis: past, present and future. Thromb Haemost, v. 98, n. 1, p. 84-9, 2007.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of Bothrops alternatus, modulates alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. Braz J Med Biol Res, v. 38, n. 10, p. 1505-11, 2005.

SENIS, Y. A. et al. Isolation and characterization of cotiaractivase, a novel low molecular weight prothrombin activator from the venom of Bothrops cotiara. Biochim Biophys Acta, v. 1764, n. 5, p. 863-71, 2006.

SERRANO, S. M. The long road of research on snake venom serine proteinases. Toxicon, v. 62, p. 19-26, 2013.

SERRANO, S. M. et al. 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, n. 4, p. 471-81, 1993a.

SERRANO, S. M.; SAMPAIO, C. A.; MANDELBAUM, F. R. Basic proteinases from Bothrops moojeni (caissaca) venom--II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP 1 and MSP 2. Toxicon, v. 31, n. 4, p. 483-92, 1993b.

SIIGUR, E. et al. Factor X activator from Vipera lebetina snake venom, molecular characterization and substrate specificity. Biochim Biophys Acta, v. 1568, n. 1, p. 90-8, 2001a.

SIIGUR, J. et al. Proteases from Vipera lebetina venom affecting coagulation and fibrinolysis. Haemostasis, v. 31, n. 3-6, p. 123-32, 2001b.

SILVA, M. B. et al. A prothrombin activator from Bothrops erythromelas (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. Biochem J, v. 369, n. Pt 1, p. 129-39, 2003.

SILVEIRA, L. B. et al. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from Bothrops moojeni snake venom. J Pharm Biomed Anal, v. 73, p. 35-43, 2013.

SINAN-SISTEMA NACIONAL DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. ESTATÍSTICA 2011. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DISPONÍVEL EM HTTP://DTR2004.SAUDE. GOV.BR/SINANWEB. ACESSADO EM 20 DE NOVEMBRO DE 2012.

SINCLAIR, A. M.; ELLIOTT, S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. J Pharm Sci, v. 94, n. 8, p. 1626-35, 2005.

SOH, U. J. et al. Signal transduction by protease-activated receptors. Br J Pharmacol, v. 160, n. 2, p. 191-203, 2010.

SOUZA, C. T. et al. Inhibition of mutalysin II, a metalloproteinase from bushmaster snake venom by human alpha2-macroglobulin and rabbit immunoglobulin. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, v. 130, n. 2, p. 155-68, 2001.

SPEIJER, H. et al. Prothrombin activation by an activator from the venom of Oxyuranus scutellatus (Taipan snake). J Biol Chem, v. 261, n. 28, p. 13258-67, 1986.

STENFLO, J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. J Biol Chem, v. 251, n. 2, p. 355-63, 1976.

STEPHANO, M. A. et al. The improvement of the therapeutic anti-Lachesis muta serum production in horses. Toxicon, v. 45, n. 4, p. 467-73, 2005.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from Bothrops atrox venom (batroxobin). Methods Enzymol, v. 45, p. 214-23, 1976.

STOCKER, K. et al. Isolation and characterization of Textarin, a prothrombin activator from eastern brown snake (Pseudonaja textilis) venom. Toxicon, v. 32, n. 10, p. 1227-36, 1994.

SUN, H. et al. Effects of temperature, pH, and inhibitors on the procoagulant characterization of FIa, a factor X activator from the venom of Daboia russellii siamensis (Myanmar). Arch Pharm Res, v. 33, n. 7, p. 1043-8, 2010.

SUNTRAVAT, M.; NUCHPRAYOON, I.; PÉREZ, J. C. Comparative study of anticoagulant and procoagulant properties of 28 snake venoms from families Elapidae, Viperidae, and purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X). Toxicon, 2010.

SUNTRAVAT, M. et al. Effect of purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X) on renal hemodynamics, renal functions, and coagulopathy in rats. Toxicon, v. 58, n. 3, p. 230-8, 2011.

SUTTIE, J. W.; JACKSON, C. M. Prothrombin structure, activation, and biosynthesis. Physiol Rev, v. 57, n. 1, p. 1-70, 1977.

SWANSON, J. C.; SUTTIE, J. W. Prothrombin biosynthesis: characterization of processing events in rat liver microsomes. Biochemistry, v. 24, n. 15, p. 3890-7, 1985.

SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. Toxicon, v. 45, n. 8, p. 1021-39, 2005.

TAKEYA, H. et al. Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains. J Biol Chem, v. 267, n. 20, p. 14109-17, 1992.

TANS, G. et al. Purification and properties of a prothrombin activator from the venom of Notechis scutatus scutatus. J Biol Chem, v. 260, n. 16, p. 9366-72, 1985.

TANS, G.; ROSING, J. Snake venom activators of factor X: an overview. Haemostasis, v. 31, n. 3-6, p. 225-33, 2001.

TAPPER, H.; HERWALD, H. Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases. Blood, v. 96, n. 7, p. 2329-37, 2000.

TERADA, S. et al. Purification and amino acid sequence of brevilysin L6, a non-hemorrhagic metalloprotease from Agkistrodon halys brevicaudus venom. J Biochem, v. 125, n. 1, p. 64-9, 1999.

TORRES, F. S. et al. Bmoo FIBMP-I: A New Fibrinogenolytic Metalloproteinase from Bothrops moojeni Snake Venom. ISRN Toxicol, v. 2012, p. 673941, 2012.

Toxicologia Aplica (UFRJ). Módulo VI: Envenenamento por animais peçonhentos. Acidentes botrópicos. Disponível em: http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mVI.a.botr. htm. Acesso: Dezembro 2010.

WEINREB, G. E. et al. Cooperative roles of factor V(a) and phosphatidylserine-containing membranes as cofactors in prothrombin activation. J Biol Chem, v. 278, n. 8, p. 5679-84, 2003.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. Toxicon, v. 45, n. 8, p. 951-67, 2005.

WIJEYEWICKREMA, L. C.; BERNDT, M. C.; ANDREWS, R. K. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. Toxicon, v. 45, n. 8, p. 1051-61, 2005.

WIJEYEWICKREMA, L. C. et al. Snake venom metalloproteinases, crotarhagin and alborhagin, induce ectodomain shedding of the platelet collagen receptor, glycoprotein VI. Thromb Haemost, v. 98, n. 6, p. 1285-90, 2007.

YAMADA, D.; SEKIYA, F.; MORITA, T. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in Echis carinatus venom with a unique catalytic mechanism. J Biol Chem, v. 271, n. 9, p. 5200-7, 1996.

YAMADA, D.; SEKIYA, F.; MORITA, T. Prothrombin and factor X activator activities in the venoms of Viperidae snakes. Toxicon, v. 35, n. 11, p. 1581-9, 1997.

YAMASHITA, K. M. et al. Bothrops jararaca venom metalloproteinases are essential for coagulopathy and increase plasma tissue factor levels during envenomation. PLoS Negl Trop Dis, v. 8, n. 5, p. e2814, 2014.

ZAMUNER, S. R. et al. Inflammation induced by Bothrops asper venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. Toxicon, v. 46, n. 7, p. 806-13, 2005.

ZAMUNÉR, S. R. et al. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. Toxicon, v. 44, n. 3, p. 259-71, 2004.

ZHANG, Y. et al. Effects of Pallas' viper (Agkistrodon halys pallas) venom on blood coagulation and characterization of a prothrombin activator. Toxicon, v. 36, n. 1, p. 143-52, 1998.

ZINGALI, RB; FRATTANI FS. Ensaios para estudo dos efeitos das toxinas sobre a agregação plaquetária. Capítulo 10; p. 105-114. In: Selistre-de-Araújo HS; de Souza DHF. Métodos em toxinologia: Toxinas de serpentes. Ed. EduFSCar. 2007.

ZWAAL, R. F.; COMFURIUS, P.; BEVERS, E. M. Lipid-protein interactions in blood coagulation. Biochim Biophys Acta, v. 1376, n. 3, p. 433-53, 1998.