UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de metaloproteases presente no soro da serpente *Bothrops alternatus*

Tatiana Zapata Palacio

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de metaloproteases presente no soro da serpente *Bothrops alternatus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Aluno: Tatiana Zapata Palacio

Orientadora: Suely Vilela

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.

Zapata Palacio, Tatiana

Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de metaloproteases presente no plasma da serpente *Bothrops alternatus.* Ribeirão Preto, 2014.

102p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Suely Vilela

1. *Bothrops alternatus* 2. BaltMPI 3. SVMPs
4. Metaloproteases 5. SVMPIs 6. Inibição de Proteases

Imagem da capa:

Foto da serpente *Bothrops alternatus* por ©2011 Fernando Bergamaschi

Projeto Cobras Brasileiras – www.cobrasbrasileiras.com.br.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: **Tatiana Zapata Palacio**

Título do trabalho: **Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de metaloproteases presente no soro da serpente *Bothrops alternatus*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Suely Vilela

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

A meu esposo e a minha família:

As palavras não me alcançam para
expressar a imensa gratidão e
amor que sinto por vocês.

Agradecimentos

Agradeço a minha família, pelo constante apoio e fortaleza, e ao meu esposo pelo apoio incondicional, por ser luz no meu caminho. Sem o amor e a confiança de todos vocês eu não teria conseguido percorrer este caminho.

À Professora Suely Vilela; agradeço imensamente por ter aberto para mim as portas do Brasil e do seu laboratório, sem isso, também não estaria hoje conquistando um sonho.

Aos amigos, muito obrigada pela amizade e risos, vocês me fazem sentir em casa.

Ao pessoal do laboratório de toxinologia, obrigada pelo companheirismo e apoio constante.

A todos os professores, funcionários e pesquisadores, que direta ou indiretamente, contribuíram nesta etapa da minha formação como pesquisadora.

À Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, pelo apoio das moradias para os Pós-Graduandos. Morar no campus é uma experiência inesquecível, e uma ajuda sem a qual teria sido muito difícil chegar à meta.

Ao Centro de Apoio ao Professor e Estudante Estrangeiro, CAPEE, pela colaboração incondicional e permanente. São vocês, Fernanda RA, Fernanda HB, e Doris, que fazem o diferencial na chegada do estudante estrangeiro no Brasil.

À CAPES e à FAPESP agradeço muito pelo financiamento.

Out of the night that covers me,
Black as the pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.

In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.

Beyond this place of wrath and tears
Looms but the horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds, and shall find, me unafraid.

It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.

William Ernest Henley

RESUMO

Palacio, T. Z. **Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de metaloproteases presente no soro da serpente *Bothrops alternatus*.** 2014. 102f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A resistência que apresentam as serpentes peçonhentas às suas próprias peçonhas, assim como a resistência observada em alguns animais está bem documentada, e é atribuída a fatores solúveis presentes no seu plasma, soro ou músculo. No caso das serpentes peçonhentas estes fatores as amparam de sofrer danos decorrentes da própria peçonha. No presente trabalho foi isolado do soro da serpente *Bothrops alternatus* um inibidor de metaloproteases, denominado BaltMPI, mediante cromatografia em DEAE Sepharose™, Superdex™ 200, MonoQ™ 5/50 GL e cromatografia de fase reversa em C18, com uma recuperação proteica de 0,3%. A massa molecular determinada para o BaltMPI por SDS - PAGE foi de 60,5 kDa, e por espectrometria de massas MALDI/TOF de 42,4 kDa. Seu ponto isoelétrico, determinado por focalização isoelétrica, é 5,27. Portanto, o BaltMPI, é um SVMPIs com caráter ácido, pertencente aos SVMPIs de baixa massa molecular. Os primeiros 60 aminoácidos da região N-terminal do BaltMPI foram determinados mediante degradação de Edman, e apresentou alto grau de homologia com a sequência para a mesma região de outros SVMPIs isolados a partir do soro de serpentes peçonhentas. Outros segmentos da sequência também foram determinados após clivagem com tripsina e posterior análise por espectrometria de massas. Posteriormente realizou-se o alinhamento da sequência parcial determinada para o BaltMPI, com a sequência do BJ46a, um SVMPI proveniente da *Bothrops jararaca*, encontrando alta homologia entre elas. Tanto o soro da serpente, quanto o inibidor, BaltMPI, inibiram a atividade hemorrágica da Batroxase, uma SVMP da classe P-I, e a da BjussuMP-I, uma SVMP da classe P-III. Já, em relação à DHM da Batroxase, foi determinado que o BaltMPI tem uma DIHM de 5ug, e uma CE50% de 0,857ug. O BaltMPI também apresentou um efeito inibitório sobre a ação proteolítica da Batroxase, sobre os substratos: fibrinogênio, fibrina e azocaseína. Sobre a atividade fibrinogenolítica da serinoprotease BjSP, o BaltMPI não apresentou um efeito inibitório, corroborando assim com a especificidade descrita para inibir as SVMPs que possuem os SVMPIs. O BaltMPI inibiu a ação hemorrágica e proteolítica da Batroxase, ao formar um complexo mediante ligações não covalentes com esta SVMP. O inibidor BaltMPI, ao igualmente aos demais SVMPIs descritos, é estável em uma ampla faixa de pH (1 – 9), e a temperaturas elevadas, sendo que em temperaturas acima de 60°C foi observada uma diminuição na sua capacidade de inibir a atividade hemorrágica da Batroxase. A inibição da atividade hemorrágica da Batroxase, quando avaliado o potencial do BaltMPI como complemento à soroterapia, foi menor à inibição observada ao realizar os testes com incubação prévia entre o inibidor e a metaloprotease. No entanto, os resultados obtidos são promissores, reforçando o grande potencial que os SVMPIs possuem, tanto como ferramentas moleculares, como opção para o tratamento dos acidentes ofídicos, em especial o acidente botrópico, no qual as SVMPs tem papel fundamental na fisiopatologia observada, e que conduz à alta morbidade associada com este tipo de acidente.

Palavras Chave: BaltMPI, *Bothrops alternatus*, Metaloproteases, SVMPs, SVMPIs, Inibição de Proteases.

ABSTRACT

Palacio, T. Z. **Isolation and biochemical and functional characterization of a metalloprotease inhibitor from *Bothrops alternatus* snake serum.** 2014. 102f Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Resistance exhibited by snakes to their own venom, as well as resistance observed in some animals has been well recorded, and has also attributed to soluble factors present in the plasma, serum or muscle. In the case of poisonous snakes, these factors protect them from damages caused by their own venom. An inhibitor, named as BaltMPI, was isolated from the snake´s serum of *Bothrops alternates*. This inhibitor was isolated through several chromatographic steps including DEAE Sepharose™, Superdex™ 200, MonoQ™ 5/50 GL and C-18 reverse phase, with a protein yield of 0.3%. Molecular mass of 60.5 kDa for BaltMPI was determined by SDS – PAGE and 42.4 kDa by MALDI/TOF mass spectrometry. Its isoelectric point, determined by isoelectric focalization, was 5.27. According to the obtained data, it was established that BaltMPI is an SVMPIs of acid character, belonging to low molecular mass SVMPIs. The first 60 aminoacids from the N-terminal region were determined by Edman degradation. This parcial sequence showed high homology to the corresponding sequence of other SVMPIs isolated from poisonous snake´s serum. Other segments from the sequence were also determined after cleavage with tripsine and MS analyses. Consequently, alignment of the partial sequence of BaltMPI with the sequence of BJ46a, a SVMPI from *Bothrops jararaca,* was made finding high homology. Both, snake´s serum and BaltMPI, inhibited the hemorragic activity of Batroxase, a class P-I SVMP, and of BjussuMP-I, a class P-III SVMP. When compared to the Batroxase DHM, it was determined a DIHM of 5µg and a CE50% of 0.857µg. BaltMPI also exhibited an inhibitory activity against the proteolitic effect of Batroxase on fibrinogen, fibrin and azocasein as substrates. On the fibrinogenolitic activity of serineprotease BjSP, BaltMPI did not showed inhibitory effect, demonstrating its specificity for inhibiting SVMPs that SVMPIs possess. BaltMPI inhibits the hemorragic and proteolitic action of Batroxase by forming a complex through non covalent linkages with that SVMP. BaltMPI, as well as other reported SVMPIs, is stable in a very high range of pH (1-9), and at high temperatures, although above 60°C a decrease in its inhibition capacity to the hemorrhagic activity of Batroxase. Inhibition of the hemorrhagic activity of Batroxase, when BaltMPI potencial as serum-therapy complement was evaluated, was less than the inhibition observed when tests by previously incubating inhibitor and metalloprotease were made. However, the results obtained are encouraging, highlighting the potential that these kind of proteins, SVMPIs, have as molecular tools, optional treatments for ophidic accidents, specially bothropic accident, in which SVMPs have a fundamental role in the observed physiopathology, leading to a high associated morbidity to this kind of accidents.

Keywords: BaltMPI, *Bothrops alternatus*, Metalloproteases, SVMPs, SVMPIs, protease inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Serpente Bothrops alternatus e a sua distribuição no Brasil. 4

Figura 2. Epidemiologia dos acidentes ofídicos por gênero de serpente no Brasil.....4

Figura 3. Classificação das Metaloproteases de peçonha de serpente – SVMPs.....8

Figura 4. Purificação da Batroxase a partir da peçonha de Bothrops atrox.....45

Figura 5. Inibição da atividade hemorrágica de metaloproteases da classe P-I e P-III pelo soro liofilizado da serpente *Bothrops alternatus*. 46

Figura 6. Fluxograma do procedimento de purificação do inibidor sérico presente na serpente *Bothrops alternatus*.. 48

Figura 7. Purificação do inibidor de Batroxase a partir do soro da serpente *Bothrops alternatus*.....49

Figura 8. Cromatografia em fase reversa. Análise do grau de pureza... 50

Figura 9. Determinação da massa molecular do inibidor BaltMPI. 51

Figura 10. Determinação da massa molecular do BaltMPI por espectrometria de massas. 52

Figura 11. Determinação do ponto isoelétrico do BaltMPI.....53

Figura 12. Comparação da sequência N-terminal do BaltMPI com outras sequências de proteínas relacionadas. 54

Figura 13. Análise comparativa da sequência parcial do inibidor BaltMPI com a sequência do fator anti-hemorrágico BJ46a.. 55

Figura 14. Dose Inibitória Hemorrágica Mínima (DIHM) do BaltMPI. 56

Figura 15. Determinação da Concentração Efetiva 50% do BaltMPI. 57

Figura 16. Avaliação da inibição da atividade hemorrágica sem incubação prévia entre o BaltMPI e a Batroxase.....57

Figura 17. Avaliação do potencial do inibidor BaltMPI como complemento à soroterapia.. 58

Figura 18. Avaliação do potencial do BaltMPI para inibir a hemorragia produzida pela BjussuMP-I, metaloprotease da classe P-III.. 58

Figura 19. Avaliação da inibição da atividade fibrinogenolítica da Batroxase pelo inibidor BaltMPI. 59

Figura 20. Avaliação da inibição da atividade fibrinolítica. 60

Figura 21. Atividade residual da Batroxase sobre a azocaseína na presença de inibidores.. 61

Figura 22. Avaliação da especificidade da ação inibitória do BaltMPI sobre proteases.....62

Figura 23. Estudo da complexação BaltMPI – Batroxase mediante SDS - PAGE....63

Figura 24. Avaliação da estabilidade do inibidor BaltMPI em diferentes pH e temperaturas.. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recuperação proteica do processo de purificação do BaltMPI.....50

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos SVMPIs 71

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AMBIC	Bicarbonato de amônio, NH_4HCO_3
BjSP	Serinoprotease isolada de *B. jararaca*
BSA	Albumina do soro bovino
Bis-acrilamida	N',N' – metileno bis-acrilamida
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CE 50%	Concentração Efetiva 50%
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DEAE	Dietilaminoetanol
DHM	Dose Hemorrágica Mínima
DIHM	Dose Inibitória Hemorrágica Mínima
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ESI	Ionização por eletrospray
FPLC	*Fast protein liquid chromatography*
GE	GE *Healthcare Life Sciences*
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
Mr	Massa molecular relativa
MS	Espectrometria de massas
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato-salino
PLA_2s	Fosfolipases A_2
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SVMPs	Metaloproteases da peçonha de serpentes
SVMPIs	Inibidores de metaloproteases da peçonha de serpentes
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N’,N’,N’,N’ – tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
TOF	Tempo de voo

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE FIGURAS iii

LISTA DE TABELAS v

LISTA DE ABREVIATURAS vi

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Ofidismo 1

1.2 Peçonhas 6

1.3 Metaloproteases 7

1.4 Inibidores de Metaloproteases 10

1.4.1 Inibidores de Metaloproteases provenientes de serpentes 15

1.5 Aspectos gerais sobre os SVMPIs 17

1.6 Complementação à soroterapia 19

2. OBJETIVOS 24

2.1 Objetivo Geral 24

2.2 Objetivos Específicos 24

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....26

3.1 Materiais.....26

3.1.1 Soro da serpente *Bothrops alternatus* 26

3.1.2 Animais 26

3.1.3 Peçonha.....26

3.1.4 Proteases.....26

3.1.5 Reagentes e outros materiais 27

3.2 Metodologia.....27

3.2.1 Obtenção do soro 27

3.2.2 Isolamento da Batroxase, metaloprotease presente na peçonha da serpente *Bothrops atrox*.....27

3.2.2.1 Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S200 27

3.2.2.2 Cromatografia de exclusão molecular em Superdex™ 75.....28

3.2.2.3 Cromatografia de troca iônica em coluna ES-502N 7C 28

3.2.2.4 Cromatografia em fase reversa em coluna CLC-ODS C18 29

3.2.3 Purificação do inibidor sérico de metaloproteases.....29

3.2.3.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose™ Fast Flow.....30

3.2.3.2 Cromatografia de exclusão molecular em Superdex™ 200.....30

3.2.3.3 Cromatografia de troca iônica em MonoQ™ 5/50 GL.....31

3.2.3.4 Cromatografia em fase reversa em CLC – ODS C18.....31

3.2.4 Determinação de proteínas.....32

3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE) 32

3.2.6 Focalização Isoelétrica.....33

3.2.7 Atividade hemorrágica 34

3.2.7.1 Inibição da atividade hemorrágica 35

3.2.7.2 Avaliação do potencial inibitório sem incubação prévia.....35

3.2.7.3 Avaliação do potencial do inibidor como complemento à soroterapia ...36

3.2.7.4 Avaliação do potencial do inibidor sobre SVMPs P-III 36

3.2.8 Avaliação da estabilidade do BaltMPI 36

3.2.9 Inibição da atividade fibrinogenolítica 36

3.2.10 Inibição da atividade fibrinolítica.....37

3.2.11 Inibição da atividade proteolítica sobre azocaseína 38

3.2.12 Determinação da massa molecular 38

3.2.12.1 Determinação da massa molecular por SDS – PAGE.....38

3.2.12.2 Determinação por espectrometria de massas MALDI/TOF/TOF MS .39

3.2.13 Complexação BaltMPI – Batroxase 39

3.2.14 Sequenciamento N-terminal 39

3.2.15 Determinação do grau de homologia por espectrometria de massas ESI-QUAD/TOF 40

3.2.16 Alinhamento das sequências homólogas 41

3.2.17 Análise estatística.....42

4. RESULTADOS.....44

4.1 Isolamento da metaloprotease presente na peçonha da serpente *Bothrops atrox* 44

4.2 Avaliação do potencial do soro da serpente *Bothrops alternatus* para inibir a atividade hemorrágica de metaloproteases 46

4.3 Purificação do inibidor de metaloproteases presente no soro da serpente *Bothrops alternatus*.....47

4.4 Determinação da massa molecular 51

4.4.1 SDS - PAGE 51

4.4.2 Espectrometria de massas MALDI/TOF/TOF MS 52

4.5 Determinação do ponto isoelétrico (pI).....53

4.6 Determinação da sequência do BaltMPI 54

4.7 Determinação da Dose Inibitória Hemorrágica Mínima (DIHM) do BaltMPI e da Concentração Efetiva 50%. 55

4.8 Avaliação da inibição sem incubação prévia. 57

4.9 Avaliação do potencial do inibidor como complemento à soroterapia. 58

4.10 Avaliação do potencial do inibidor sobre SVMPs P-III. 58

4.11 Inibição da atividade Fibrinogenolítica 59

4.12 Inibição da atividade Fibrinolítica 60

4.13 Inibição da atividade proteolítica sobre azocaseína.....61

4.14 Avaliação da especificidade do BaltMPI. 62

4.15 Estudo da complexação BaltMPI – Batroxase. 63

4.16 Estabilidade do inibidor BaltMPI 63

5. DISCUSSÃO 66

6. CONCLUSÕES 85

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88

8. ANEXO.....102

Anexo 1. Certificado Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais.....102

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ofidismo

Nos últimos anos os acidentes por serpentes peçonhentas têm sido considerados um sério problema de saúde pública em países em desenvolvimento localizados em áreas tropicais e subtropicais da África, Ásia, América Latina e Oceania (Borges *et al.*, 2000; Pinho e Pereira, 2001; Kasturiratne *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2010a; WHO, 2010; Nori *et al.*, 2014).

Igualmente, devido à ampla distribuição das serpentes peçonhentas, ao extensivo número de acidentes, à complexidade do quadro clínico que acarretam e, ao fato de ser a população mais atingida constituída predominantemente por trabalhadores de comunidades rurais pobres, desde o ano de 2007 a Organização Mundial da Saúde tem categorizado estes acidentes ofídicos como doença negligenciada (Warrell *et al.*, 2007; Harrison *et al.*, 2009; De Souza, 2010; WHO, 2010).

Estima-se que a cada ano no mundo acontecem 421.000 envenenamentos por serpentes peçonhentas, dos quais 20.000 derivam em óbito. Vários autores sugerem uma ocorrência maior dos acidentes ofídicos, devido a dados subestimados pela falta de informação sobre o verdadeiro impacto epidemiológico, isto porque nos países mais afetados pelo problema, os programas epidemiológicos são pouco estruturados e, portanto, não existe ainda, dados confiáveis a respeito da verdadeira magnitude da ocorrência destes acidentes, visto que as estatísticas de saúde incluem unicamente os casos em que ocorreram a hospitalização da vítima, ficando sem notificação os acidentes que o afetado não recebeu atenção médica (Kasturiratne *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2010a; WHO, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2011).

Adicionalmente, a maioria dos governos desses países não tem programas prioritários que visem à prevenção dos acidentes ofídicos, ou o melhoramento significativo do acesso ao sistema de saúde das comunidades mais atingidas por estes (Warrell *et al.*, 2007; Nori *et*

al., 2014). Isto revela a pouca importância dada ao problema o que tem impossibilitado, em parte, a formulação de políticas efetivas para a abordagem do mesmo (Bochner e Struchiner, 2003; Kasturiratne *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2009).

No Brasil a notificação desses acidentes ofídicos é obrigatória desde 1988, porém, tem sido observado no curso dos anos falta de continuidade no registro adequado da informação epidemiológica, o que ocasiona que os dados de morbidade e mortalidade provenientes dos acidentes ofídicos ainda se sejam subestimados (Bochner e Struchiner, 2002). Esta falta de continuidade se deve principalmente a dois fatores: 1) No começo a obrigatoriedade estava ligada ao uso do soro antiofídico, devido à escassez deste no país, assim quando a produção do soro foi estabilizada, houve uma diminuição das notificações, mas não dos acidentes e, 2) As mudanças nos sistemas e formulários indicados pelo Ministério da Saúde tem dificultado a realização da notificação (Bochner e Struchiner, 2003; De Souza, 2010).

Contudo, desde o ano 1990 este Ministério tem estabelecido o Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, para a notificação e investigação de casos de doenças e agravos que figuram na lista nacional de doenças de notificação compulsória, na qual estão incluídos os acidentes ofídicos. Segundo os dados tabulados pelo SINAN para o ano de 2012, no Brasil foram registrados 29.062 acidentes ofídicos, sendo que 127 deles terminaram em óbito (SINAN, 2014).

Outro fator que contribui para a complexidade do problema é a ampla distribuição das serpentes peçonhentas, sendo encontradas em quase todo o mundo, exceto nos polos, as altas altitudes e algumas ilhas (Kasturiratne *et al.*, 2008). Segundo a *The Reptile Database* (Uetz, 2014), atualmente existem identificadas no mundo 3.458 espécies de serpentes e, estima-se que dessas, 600 são peçonhentas, as quais estão classificadas em quatro famílias: *Colubridae, Elapidae, Viperidae* e *Atractaspididae*. No Brasil existem 366 espécies de serpentes sendo que, 55 são consideradas peçonhentas e pertencem as famílias *Elapidae* e *Viperidae* (Bernarde, 2011; Sajevic *et al.*, 2011). Porém, podem acontecer alterações na classificação existente das serpentes peçonhentas devido a que ainda estão

sendo descobertas e classificadas novas espécies e, a que novas informações taxonômicas estão sendo obtidas à medida que podem se analisar novos dados com tecnologias mais avançadas. Essas modificações podem englobar a adição de novas espécies ou a reclassificação das já conhecidas (WHO, 2010; Carrasco *et al.*, 2012).

Neste sentido, foi proposta uma nova classificação para as serpentes da família *Viperidae* da América do Sul por Fenwick *et al.* (2009) baseada na análise conjunta de, informações taxonômicas prévias e novos dados moleculares e morfológicos. Nesta nova classificação o gênero *Bothrops*, pertencente a esta família, foi divido em cinco gêneros: *Bothriopsis, Bothrocophias, Bothropoides, Bothrops* e *Rhinocerophis*. Ficando classificada neste último gênero a serpente *Bothrops alternatus* e sendo renomeada como *Rhinocerophis alternatus*. Entretanto esta nova classificação ainda não foi acolhida amplamente pela comunidade científica. Prova disso são os resultados obtidos ao realizar uma busca dos termos "*Bothrops alternatus*" e "*Rhinocerophis alternatus*" na base de dados Scopus (2014) no período de tempo 2009 – 2014. Foram encontrados 5 artigos nos quais foi citado unicamente o nome "*Rhinocerophis alternatus*", 2 artigos onde foram citados ambos os nomes e, 45 artigos onde foi citado unicamente o nome "*Bothrops alternatus*". Por este motivo neste trabalho levamos em conta a classificação anterior à feita por Fenwick (2009) e decidimos continuar utilizando o nome *Bothrops alternatus*.

Posto isto, as serpentes peçonhentas presentes no Brasil pertencem a quatro gêneros: as serpentes do gênero *Micrurus* (coral-verdadeira) pertencentes à família *Elapidae*, e as serpentes dos gêneros *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca), *Crotalus* (cascavel) e *Lachesis* (surucucu, surucutinga, pico-de-jaca) pertencentes à família *Viperidae*. (Pinho e Pereira, 2001; Bernarde, 2011).

Figura 1. Serpente Bothrops alternatus e a sua distribuição no Brasil.

As serpentes do gênero *Bothrops* estão distribuídas por todo o Brasil, dentro do qual encontram-se *Bothrops atrox*, a espécie de serpente mais encontrada na Amazônia, principalmente, em beiras de rios e igarapés, assim como a *Bothrops alternatus*, uma serpente que vive em campos e outras áreas abertas, desde a região Centro-oeste até o Sul do país, e uma das mais conhecidas devido ao padrão característico da sua pele (Figura 1) (Pinho e Pereira, 2001; Tokarnia e Peixoto, 2006; Ministério de Saúde, 2009).

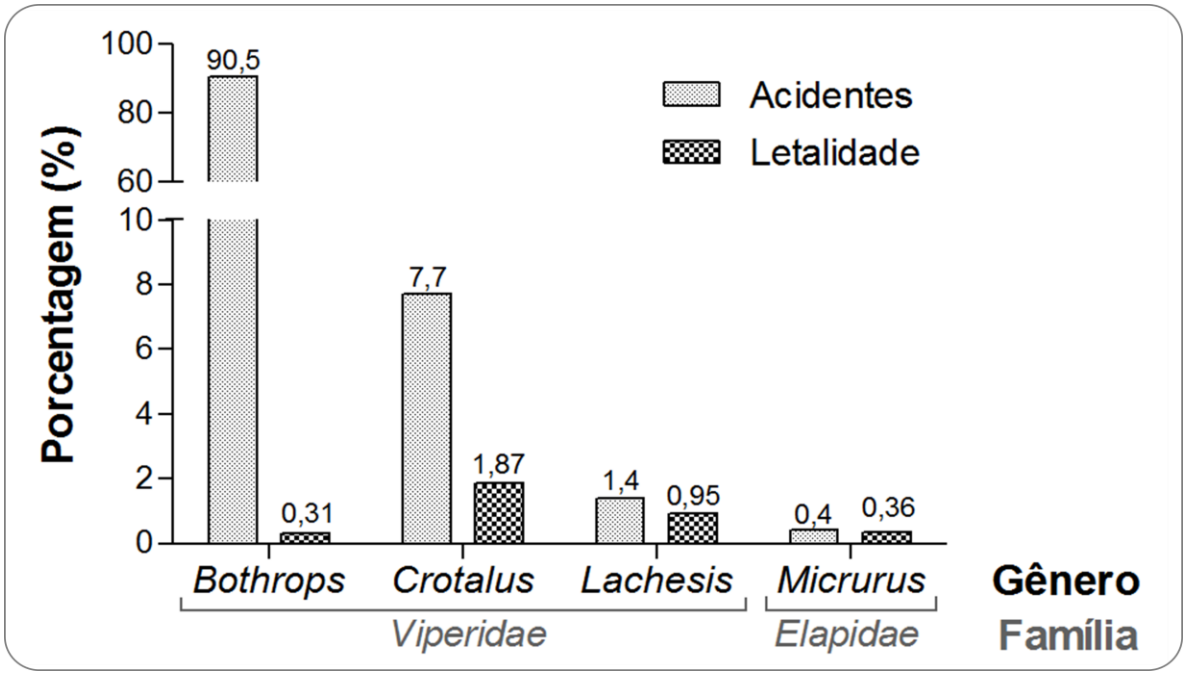

Figura 2. Epidemiologia dos acidentes ofídicos por gênero de serpente no Brasil.
(Fonte dos dados: FUNASA 2001)

As serpentes do gênero *Bothrops* representam, do ponto de vista epidemiológico, o grupo mais importante de serpentes peçonhentas no Brasil por serem responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos no país, apesar das serpentes do gênero *Crotalus* apresentar uma porcentagem maior de letalidade, como indicado na Figura 2. Contudo, a morbidade produzida pelo número de acidentes botrópicos é muito maior (FUNASA, 2001; Pinho e Pereira, 2001; Bernarde, 2011).

Essa elevada morbidade deve-se principalmente a dois fatores: o extenso número de acidentes produzidos pelas serpentes do gênero *Bothrops* e as características do quadro clínico que resulta desses acidentes botrópicos. Este quadro clínico caracteriza-se por uma fisiopatologia e efeito proteolítico intenso, com rápido e drástico dano, tanto local quanto sistêmico (Costa *et al.*, 2003; Vilca-Quispe *et al.*, 2010). A picada em nível local produz dor intensa e edema que se desenvolve rapidamente resultando em equimoses, bolhas ou flictenas, hemorragias locais e eritema (Gay *et al.*, 2009). Nos casos mais graves podem acontecer dermonecroses, mionecroses e infecções bacterianas que podem acarretar incapacidade física permanente por danos musculares importantes (perda funcional) ou pela perda anatômica do membro agredido, o que acarreta danos e sequelas físicas permanentes com um alto impacto socioeconômico e psicológico, em razão de que são acometidos homens (70%) e mulheres (20%). Esta população normalmente se encontra em uma faixa etária de 15 a 49 anos em 52,3% das notificações, idade na qual se concentra a força de trabalho, além de ser o pé e a perna os locais mais atingidos pela picada (70,8%), seguidos da mão e do antebraço (13,4%) (FUNASA, 2001; Pinho e Pereira, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2010a).

O dano sistêmico se evidência pela presença de hemorragias distais: gengivorragias, epistaxes, hematêmese e hematúria, que se manifestam devido ao esgotamento dos fatores da cascata de coagulação pela ação proteolítica das metaloproteases e outras toxinas presentes na peçonha, como serinoproteases e fosfolipases, o que resulta em uma condição patológica conhecida como coagulação intravascular disseminada. Esta patologia não sendo

tratada adequada ou oportunamente pode induzir ao choque cardiovascular por hipovolemia e a falha renal aguda secundária à necroses tubular aguda. Isto, somado ao fato de que nos envenenamentos moderados e graves, a septicemia é uma complicação comum, devido às condições favoráveis para a multiplicação das baterias presentes na boca, falanges e peçonha da serpente, se apresenta como um quadro clínico muito grave e complexo que pode levar a vítima do acidente ofídico à morte (Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Pinho e Pereira, 2001; Costa *et al.*, 2003; Mazzi *et al.*, 2004; Gay *et al.*, 2009; Otero, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2010b; Calvete *et al.*, 2011; Asega *et al.*, 2014).

1.2 Peçonhas

Todas as serpentes da família *Viperidae* possuem dentição do tipo solenóglifo, o que lhes permite injetar a peçonha, produzida e armazenada em duas glândulas localizadas na parte posterior da mandíbula, na presa ou agressor (Jackson, 2007; Vonk *et al.*, 2008).

Esta peçonha é uma mistura muito complexa de componentes tóxicos e não tóxicos, de tipo proteico, orgânico e mineral, com atividade farmacológica, com ou sem atividade enzimática. Isto faz com que os efeitos biológicos produzidos pela peçonha sejam muito complexos, pois cada um dos componentes exerce a sua atividade e ao mesmo tempo potencializa a atividade dos outros componentes mediante uma ação sinérgica. É, em grande parte, esta complexidade biológica da peçonha o que tem feito das serpentes, depredadores eficientes, localizados geralmente no topo da cadeia alimentar. Sendo esta, a depredação mediante imobilização ou morte da presa, uma das principais funções da peçonha da serpente, assim como facilitar sua digestão e possibilitar a defesa de possíveis atacantes ou rivais (Chippaux *et al.*, 1991; Tanizaki *et al.*, 1991; Calvete *et al.*, 2005; Kini, 2005; Porto *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2012).

Adicionalmente, além desta complexa composição, as peçonhas apresentam grande variabilidade tanto interespécie quanto intraespécie na proporção dos seus componentes, o que se deve a fatores como: origem geográfica, alimentação, idade, gênero, clima,

vegetação, crescimento ou não em cativeiro (Meier, 1986; Chippaux *et al.*, 1991; Francischetti *et al.*, 2000; Saldarriaga *et al.*, 2003; Queiroz *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2009; Boldrini-Franca *et al.*, 2010; Saad *et al.*, 2012).

Contudo, as substâncias encontradas na peçonha podem ser classificadas em três grandes grupos: compostos orgânicos com baixo peso molecular, compostos inorgânicos e proteínas. Sendo que estas últimas podem chegar a representar mais de 90% do peso seco da peçonha. Dentre estas proteínas estão as enzimas, que tem ampla diversidade farmacológica e importante função nos efeitos decorrentes da peçonha nos acidentes ofídicos. Dentre este grupo destacam-se as fosfolipases, serinoproteases e metaloproteases, sendo que estas últimas tem papel relevante na fisiopatologia do acidente botrópico (Ramos e Selistre-De-Araujo, 2006; Porto *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2012; Asega *et al.*, 2014).

1.3 Metaloproteases

As metaloproteases de peçonha de serpente, SVMPs por sua sigla do inglês *Snake Venom Metalloproteases*, estão presentes na maioria das peçonhas das serpentes da família *Viperidae* e representam no mínimo 32% do total da peçonha, estando assim entre as toxinas mais abundantes nas peçonhas desta família e tendo especial significância nos efeitos decorrentes dos acidentes ofídicos produzidos pelas serpentes do gênero *Bothrops* (Gutiérrez *et al.*, 2005; Fox e Serrano, 2008; Fox e Serrano, 2009; Markland e Swenson, 2013).

Estas SVMPs pertencem, junto com as ADAMs (enzimas com domínios desintegrina e metaloprotease), à família M12B das reprolisinas (também conhecidas como adamalisinas) do clã MA(M) das metzincinas. Estas SVMPs são enzimas dependentes de zinco, onde os ligantes do zinco no sitio catalítico são as três histidinas do *motif* HEXXHXXGXXH, seguido por um *Met-turn*, uma característica altamente conservada estrutural e espacialmente destas proteínas onde uma metionina, localizada 24 resíduos depois da primeira histidina ligante do

zinco, forma uma base hidrofóbica para o zinco no sitio catalítico (Nagase, 2001; Fox e Serrano, 2005; Ramos e Selistre-De-Araujo, 2006; Fox e Serrano, 2010; Tallant *et al.*, 2010).

A figura 3 mostra como as SVMPs foram classificadas por (Fox e Serrano, 2005; Fox e Serrano, 2008) nos grupos P-I, P-II e P-III, segundo a presença ou ausência dos domínios diferentes ao domínio protease.

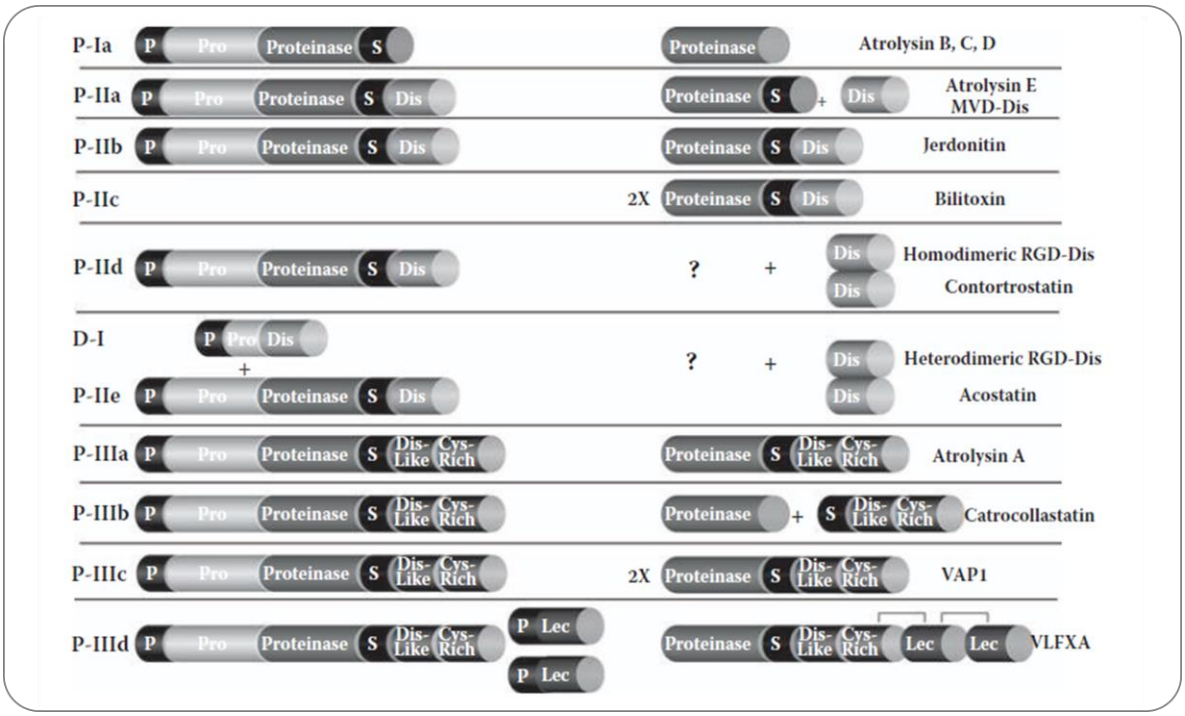

Figura 3. Classificação das Metaloproteases de peçonha de serpente – SVMPs.
(Imagem reimpressa de Fox e Serrano, 2008, com autorização de Wiley)

O grupo P-I é formado por metaloproteases que unicamente possuem o domínio catalítico no qual apresentam de duas a três pontes dissulfeto. As metaloproteases desse grupo tem uma massa molecular na faixa de 20 - 30 kDa, e exibem uma atividade hemorrágica fraca. Como exemplos deste grupo estão as metaloproteases Acutolysin A, Atrolysin I, Atrolysin C, BnP1 e Batroxase (Fox e Serrano, 2008; Fox e Serrano, 2009; Gay *et al.*, 2009; Fox e Serrano, 2010; Cintra *et al.*, 2012).

Já o grupo P-II inclui metaloproteases que, além do domínio catalítico no qual existem de cinco a sete resíduos de cisteína, possuem um domínio desintegrina que, na maioria dos casos possui o *motif* RGD. Por sua vez, este grupo esta dividido em cinco subgrupos segundo o número de resíduos de cisteína e as modificações pós - traducionais sofridas nos

seus domínios depois da sua passagem através do retículo endoplasmático rugoso. A massa molecular das metaloproteases deste grupo está na faixa de 30-60 kDa. Exemplos deste grupo são Trigramin, Atrolysin E, Flavostatin e Jerdonitin (Fox e Serrano, 2005; Fox e Serrano, 2008)

Por último, no grupo P-III estão as metaloproteases que além do domínio catalítico, no qual apresentam de seis a sete resíduos de cisteína, estão constituídas por um domínio tipo desintegrina, no qual o *motif* RGD típico das desintegrinas é substituído pelo *motif* ECD; a este domínio lhe segue um domínio rico em resíduos de cisteína na região C – terminal. Este grupo se divide em quatro subgrupos: P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc e P-IIId, segundo a posição do sétimo resíduo de cisteína no domínio catalítico. Este sétimo resíduo de cisteína é chamado de cisteína–impar (*odd cysteinyl*) e tem papel fundamental nas modificações pós–traducionais observadas nas metaloproteases, como a dimerização com outras subunidades. O mesmo acontece com o resíduo de cisteína–impar no grupo P-II. Adicionalmente, o grupo P-IIId, como resultado de uma modificação pós – traducional, possui dois domínios de lectinas ligados mediante pontes de sulfeto à região C – terminal. As metaloproteases deste grupo são as maiores, com massas moleculares de 60 a 100 kDa, e também as que produzem uma hemorragia mais potente (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Ramos e Selistre-De-Araujo, 2006; Fox e Serrano, 2008; Fox e Serrano, 2009; Gay *et al.*, 2009; Fox e Serrano, 2010).

Como evidênciado na classificação anterior, todas as metaloproteases possuem o domínio catalítico, e mesmo não conhecendo ainda o mecanismo exato mediante o qual estas proteínas agem, acredita-se que é este o domínio responsável pela degradação das proteínas da membrana basal (fibronectina, laminina e colágeno tipo IV) e das superfícies endoteliais (integrina, cadhelina), e que resulta no extravasamento sanguíneo e transtorno do sistema hemostático (Baramova *et al.*, 1989; Baldo *et al.*, 2010; Takeda *et al.*, 2012). Desta forma, é factível pensar que os domínios tipo desintegrina e ricos em resíduos de cisteína, presentes nas metaloproteases do grupo P-IIId, tem alguma função na

fisiopatologia da hemorragia resultante da ação destas proteínas (Baldo *et al.*, 2010; Escalante *et al.*, 2011; Paes Leme *et al.*, 2012; Takeda *et al.*, 2012; Asega *et al.*, 2014).

Além da atividade hemorrágica, as metaloproteases são reconhecidas como proteínas que possuem alta atividade biológica, e a relevância que tem na fisiopatologia do envenenamento botrópico não está limitada ao efeito hemorrágico *per rhexis*, pois elas também agem como: proteínas coagulantes ao ativar diretamente a protrombina e o fator X da cascata de coagulação, e como proteínas anticoagulantes ao apresentar atividade fibrino(geno)lítica, ao degradar as cadeias α, β e/ou γ do fibrinogênio e o fator de *Von Willebrand* e portanto, inibem a agregação plaquetária. É esta atividade proteolítica sobre fatores da cascata da coagulação a responsável pelos efeitos sistêmicos das metaloproteases que, conjuntamente com a ação das outras toxinas presentes na peçonha, conduz ao estado de coagulação vascular disseminada, observado nos casos graves de acidentes botrópicos (Ramos e Selistre-De-Araujo, 2006; Escalante *et al.*, 2011).

1.4 Inibidores de Metaloproteases

Abbé Felice Fontana, fisiologista e naturista italiano, considerado o fundador da toxinologia moderna, em 1781 fez a seguinte observação “a peçonha da *viper* não é venenosa para suas espécies”. Sendo que desde então foram feitos numerosos experimentos e observações sobre o efeito da peçonha de serpentes sobre mamíferos, peixes, aves e as mesmas serpentes, e sobre a neutralização ou contenção dos efeitos do envenenamento pelo uso de certas plantas, tudo isso com o intuito de entender mais e explicar melhor a capacidade de neutralizar os efeitos deletérios das peçonhas ofídicas que alguns desses organismos exibiam (Domont *et al.*, 1991; Hawgood, 1995).

Desta forma, a partir de todo o conhecimento que foi e segue sendo gerado mediante as pesquisas no campo, evidenciou-se que na natureza as proteínas como as fosfolipases, serinoproteases e metaloproteases contidas nas peçonhas de serpente, encontram correspondência em inibidores presentes nas plantas e no plasma, soro e/ou músculo de

alguns mamíferos e serpentes tanto peçonhentas quanto não peçonhentas. O que é muito interessante, considerando-se que o equilíbrio nos organismos entre estas proteínas e seus inibidores é o que garante o funcionamento adequado de muitos processos biológicos dentro de um complexo sistema que é muito dinâmico (Yong *et al.*, 1998; Perez e Sanchez, 1999; Ramos e Selistre-De-Araujo, 2001; Perales *et al.*, 2005; Milward *et al.*, 2007; Magrioti e Kokotos, 2010; Rawlings *et al.*, 2014).

Além destes inibidores naturais, também existem condições químicas ou físicas que podem inibir estas proteínas segundo as suas características estruturais e funcionais, no caso das SVMPs, as quais perdem a sua atividade catalítica pela ação de agentes quelantes (EDTA ou p-hidroxifenantrolina) sobre o íon zinco do qual dependem substancialmente. Assim mesmo, sua atividade catalítica e solubilidade pode ser perdida ou reduzida drasticamente pela exposição a pH ácidos em consequência da polarização que sofre o resíduo de glutamato e a protonização dos três resíduos de histidina presentes no domínio catalítico da protease, todos eles fundamentais para a interação com o zinco. Igualmente, a atividade catalítica das SVMPs também é irreversivelmente danificada após submissão a altas temperaturas devido à desnaturação da sua estrutura terciária (Manning, 1995; Fox e Serrano, 2005; Ramos e Selistre-De-Araujo, 2006; Naves de Souza *et al.*, 2012)

No entanto, são os inibidores naturais destas SVMPs, designados SVMPIs por sua sigla do inglês *Snake Venom Metalloproteases Inhibitors*, os que apresentam um papel importante na neutralização dos efeitos deletérios decorrentes destas proteases nos animais que os possuem, assim como na neutralização observada após utilizar plantas com propriedades antiofídicas para o tratamento dos acidentes ofídicos (Sanchez e Rodriguez-Acosta, 2008).

O uso das plantas para fins medicinais tem sido feito e registrado desde a antiguidade. Já o uso destas no tratamento dos acidentes ofídicos, que se dá geralmente em forma de emplastro ou infusão, foi reconhecido há mais de cem anos por cientistas. Entre as primeiras observações das quais se tem registro datam de 1871 e foram feitas pelo médico

francês Henri Bocquillon-Limousin (Mors *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2005; Dey e De, 2012). Mesmo assim, foi apenas duas a três décadas atrás que o estudo acerca das propriedades antiofídicas das plantas começou a despertar maior interesse por parte da comunidade científica, pois apesar de existirem muitos registros sobre o uso destas nos acidentes ofídicos, são menos numerosas as evidências científicas que apoiam essas propriedades (Martz, 1992; Strauch *et al.*, 2013).

O uso destas plantas se dá principalmente em comunidades rurais afastadas das redes hospitalares e, que portanto, não conseguem ter acesso oportuno à atenção médica para a aplicação do soro antiofídico após um acidente, assim como em comunidades nas quais a medicina tradicional e o conhecimento popular ainda estão arraigados, e o uso das plantas é a primeira opção, as vezes também a única disponível, para o tratamento dos acidentes ofídicos (Otero *et al.*, 2000; Biondo *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2005; Strauch *et al.*, 2013; Vasquez *et al.*, 2013).

Entre as plantas com propriedades antiofídicas utilizadas no Brasil e, das quais também existe evidência científica, podem-se destacar algumas que inibem total ou parcialmente algumas atividades das peçonhas ou toxinas botrópicas previamente isoladas.

A *Casearia sylvestris*, conhecida popularmente como guaçatonga, é uma planta arbórea amplamente distribuída pelo Brasil que, além de ser utilizada por suas propriedades antiofídicas, é empregada também no tratamento de outras doenças, como a úlcera gástrica, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes (Borges *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2011). Como descrito por Borges et al. (2001), foi observada uma neutralização significativa pelo extrato aquoso das folhas da *C. sylvestris*, sobre a atividade hemorrágica produzida por doses três vezes maiores à dose hemorrágica mínima das peçonhas das serpentes: *Bothrops asper*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops pirajai*, assim como das metaloproteases BaP1 e BH4 isoladas da peçonha da *Bothrops asper*, e da Bn2, metaloprotease isolada da peçonha da *Bothrops neuwiedi* (Borges *et al.*, 2001).

Outro exemplo é a *Pentaclethra macroloba*, uma planta amazônica conhecida com o nome de *pracaxi*. A partir da casca macerada desta planta foi preparado um extrato aquoso que inibiu significativamente a hemorragia produzida pela peçonha das serpentes *Bothrops atrox* e *Bothrops asper* (da Silva *et al.*, 2005). Posteriormente foram isolados desta planta, dois compostos: macrolobina A e macrolobina B, que são saponinas terpênicas que neutralizaram as atividades hemorrágica, fibrino(geno)lítica e proteolítica de metaloproteases do grupo P-I e P-III isoladas das peçonhas de *Bothrops jararacussu*, e *Bothrops neuwiedi* (da Silva *et al.*, 2007a). Sendo estes dados concordantes com as observações realizadas por outros autores, que declaram que as propriedades antiofídicas das plantas são o resultado da interação entre os metabólitos secundários das plantas e as toxinas presentes na peçonha (Mors *et al.*, 2000; Vasquez *et al.*, 2013).

Por outra parte, à resistência natural que apresentam alguns animais, mamíferos pequenos e serpentes, aos efeitos decorrentes do envenenamento por peçonhas ofídicas, pode-se dar mediante dois mecanismos, um é a presença em seu plasma, soro ou músculo de fatores neutralizantes ou inibidores que agem como ligantes das toxinas presentes na peçonha, inibindo rápida e eficazmente os efeitos deletérios do envenenamento ofídico, o que lhes confere imunidade parcial ou total frente aos efeitos derivados da picada por serpentes peçonhentas (Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Jurgilas *et al.*, 2003; Perales *et al.*, 2005; Biardi e Coss, 2011). Já, o outro mecanismo consiste em que as toxinas presentes na peçonha das serpentes não conseguem se ligar a receptores, sendo este o motivo pelo qual toxinas como a α-bungarotoxina, potente neurotoxina presente na peçonha da serpente *Bungarus multicinctus*, não exerce seu efeito tóxico no mangusto, pois a conformação estrutural dos receptores nicotínicos neste é diferente à conformação encontrada para estes receptores na maioria dos mamíferos suceptiveis a essa toxina, aos quais se liga irreversível e competitivamente produzindo paralisia, falha respiratória e morte da presa/vítima (Barchan *et al.*, 1992). Ambos mecanismos correspondem a um fenômeno de imunidade natural,

resultado de milhões de anos de evolução filogenética (Sanchez e Rodriguez-Acosta, 2008; Neves-Ferreira *et al.*, 2010).

Já entre os animais que possuem no seu organismo fatores neutralizantes, o exemplo das espécies do gênero *Didelphis* spp, resistentes a várias peçonhas de serpentes da família *Viperidae*, é um dos mais referenciados na literatura científica. No Brasil, os membros do gênero *Didelphis marsupialis* são conhecidos como gambá ou gambá comum. Do plasma deste marsupial foi isolado e caracterizado parcialmente por Perales et al. (1994) o complexo antibotrópico (ABC), composto por duas glicoproteínas hidrofóbicas de caráter ácido de 43 e 48 kDa, que apresentaram atividade anti-hemorrágica, anti-mionecrótica e anti-edematogênica, sendo assim efetivo na inibição dos efeitos produzidos pelas metaloproteases, mas não pelas serinoproteases presentes na peçonha, o que evidenciou a especificidade inibitória deste complexo ABC, e identificou-o como o responsável pela imunidade observada neste marsupial à peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* spp (Perales *et al.*, 1994).

Posteriormente, Neves-Ferreira et al. (2000) elucidaram que este complexo ABC está conformado por duas glicoproteínas ácidas e hidrofóbicas que foram nomeadas DM40 e DM43, em virtude da espécie da qual provêm (*Dildelphis marsupialis*) e das suas massas moleculares de 40 e 43 kDa, respectivamente. Ambas as proteínas apresentaram as propriedades anti-hemorrágicas observadas inicialmente no complexo ABC e, além disso, inibiram a hidrólise da caseína, do fibrinogênio e da fibronectina produzida pela peçonha da *Bothrops jararaca* (Neves-Ferreira *et al.*, 2000).

A esse gênero *Didelphis*, também pertence o *Didelphis virginiana*, conhecido como opossum e presente em grande parte da América do Norte, e do qual foi reportado por Kilmon em 1976 a alta resistência às peçonhas das serpentes *Crotalus adamanteus, Crotalus horridus, Agkistrodon piscivorus, Vipera russelli* e *Naja kaouthia*, após injetar no marsupial doses superiores às letais da peçonha de cada uma dessas serpentes e observar que além de não produzir a morte no animal, esse não apresentou edema, necrose e/ou

hematoma notáveis (Kilmon Sr, 1976). Em consequência, foi isolada a partir do soro deste marsupial por Menchaca e Perez (1981) uma proteína com massa molecular de 68 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 4,1, que inibiu a atividade hemorrágica produzida pela peçonha da serpente *Crotalus atrox* (Menchaca e Perez, 1981). Também do plasma do *D. virginiana*, foi isolada por Catanese e Kress (1992) uma glicoproteína com massa molecular de 52 kDa e pI de 3,5, nomeada oprin (*opossum proteinase inhibitor*), e que inibe a Atrolysin A e outras metaloproteases hemorrágicas presentes na peçonha da serpente *Crotalus atrox*, mas não as serinoproteases contidas na mesma peçonha (Catanese e Kress, 1992).

Por outro lado, esquilos da espécie *Spermophilus beecheyi* amplamente distribuídos no ocidente dos Estados Unidos, são mais um exemplo de mamífero pequeno que apresenta resistência à peçonha de serpente. Do plasma desses esquilos foi isolado por Biardi et al. (2011), um inibidor de metaloproteases com massa molecular de 108,3 kDa e pI de 5,1, que demonstrou inibir em mais de 75% a atividade hemorrágica produzida pela peçonha das serpentes *Crotalus oreganus oreganus* e *Crotalus viridis viridis*, e em praticamente 40% a mesma atividade quando produzida pela serpente *Crotalus atrox* (Biardi *et al.*, 2011).

1.4.1 Inibidores de Metaloproteases provenientes de serpentes

A resistência à peçonha de serpentes não é uma propriedade exclusiva de alguns mamíferos, pois esta também tem sido evidenciada nas próprias serpentes, as quais são resistentes à sua peçonha e às peçonhas de outras serpentes que pertencem à mesma família, o que as ampara de sofrer danos deletérios pela sua própria peçonha se, acidentalmente, esta chegasse à circulação, ou pela peçonha de outra serpente caso chegassem a ser agredidas. Do mesmo modo é conhecida a resistência de algumas serpentes não peçonhentas, de hábitos ofiófagos ou não, a algumas peçonhas de serpentes (Vanphilpot *et al.*, 1978; Cerdas e Lomonte, 1982; Lomonte *et al.*, 1982; Perales *et al.*, 1994; Perales *et al.*, 2005; Sanchez e Rodriguez-Acosta, 2008).

Neste sentido, podem ser encontrados na literatura vários exemplos de inibidores de metaloproteases (fatores anti-hemorrágicos) identificados e/ou isolados a partir do plasma ou soro de serpentes e, entre os que se encontram mais amplamente caracterizados podem ser citados, o HSF da serpente *Trimeresurus flavoviridis*, uma espécie endêmica das ilhas japonesas Ryukyu e pertencente à família *Viperidae* (Omori-Satoh *et al.*, 1972; Omori-Satoh, 1977), o BaSAH da serpente *Bothrops asper* (Borkow *et al.*, 1995) e, o BJ46a da serpente *Bothrops jararaca* (Valente *et al.*, 2001), todos eles isolados a partir do soro de serpentes (Perales *et al.*, 2005; Neves-Ferreira *et al.*, 2010).

O fator anti-hemorrágico HSF (*Habu serum factor*) é uma glicoproteína ácida que conseguiu inibir a atividade hemorrágica de duas metaloproteases autólogas, HR1 e HR2, pertencentes ao grupo P-III e P-I das SVMPs, respectivamente. Sua massa molecular é de 70 kDa na sua forma nativa, e de 47,8 kDa quando determinada por MALDI-TOF, sendo seu pI de 4,0. Adicionalmente, também foi avaliada a inibição da atividade hemorrágica de várias peçonhas pelo soro da serpente *Habu* (*T. flavoviridis*), sendo encontrado que inibe mais efetivamente a hemorragia produzida por peçonhas de serpentes homólogas e pertencentes à mesma família, do que, a hemorragia produzida por peçonhas de serpentes de outras famílias, sobre as quais apresentou uma inibição pobre (Omori-Satoh *et al.*, 1972; Omori-Satoh, 1977; Deshimaru *et al.*, 2005).

Os fatores anti-hemorrágicos, cMSF, isolado do soro da serpente chinesa *Gloydius blomhoffii brevicaudus*, e o jMSF, isolado do soro da serpente japonesa *Gloydius blomhoffi*, por Aoki *et al.* (2008), são glicoproteínas ácidas, cada um com massa molecular de 40,5 kDa, o primeiro deles inibe a ação hemorrágica da peçonha autóloga, e ambos os dois inibem a ação hemorrágica de várias metaloproteases da classe P-I e P-III (Aoki *et al.*, 2008).

Por outro lado, o fator BaSAH (*Bothrops asper serum antihemorrhagin*), é um potente fator anti-hemorrágico que neutraliza a ação hemorrágica da peçonha autóloga bruta. Esse fator é uma proteína albumina – símile, com massa molecular de 66 kDa e pI de 5,2.

Também foi observada a inibição por esse fator sobre a BaH1, metaloprotease P-III que é uma das principais metaloproteases hemorrágicas da peçonha de *Bothrops asper*, assim como uma neutralização mais eficiente por parte do soro da mesma serpente sobre os efeitos hemorrágicos, letais, hemolíticos e citostáticos produzidos pela peçonha autóloga, quando comparado com outros agentes, entre eles um soro polivalente utilizado na soroterapia dos acidentes ofídicos (Borkow *et al.*, 1995).

Por último, o fator BJ46a (*Bothrops jararaca serum 46 kDa isoform a*), é uma glicoproteína ácida com massa molecular de 46 kDa (homodímero de 79 kDa em seu estado nativo) e pI de 4,6. Este fator inibiu a atividade hemorrágica da peçonha de *Bothrops jararaca*, assim como a atividade das metaloproteases Atrolysin C e Jararhagin, sendo a primeira uma metaloprotease P-I da peçonha de *Crotalus atrox*, e a segunda uma metaloprotease P-III da peçonha de *Bothrops jararaca* (Valente *et al.*, 2001).

1.5 Aspectos gerais sobre os SVMPIs

A partir de todo o conhecimento adquirido ao longo dos anos acerca dos inibidores de metaloproteases presentes no músculo, soro e/ou plasma de mamíferos pequenos, e no soro e/ou plasma de serpentes, que apresentam uma resistência inerente aos efeitos produzidos pelas peçonhas de serpentes peçonhentas, tem sido possível delinear tanto as características estruturais gerais que esses SVMPIs apresentam, quanto a sua relação função - estrutura, o que tem permitido não só a sua classificação, mas também um melhor entendimento sobre os processos biológicos nos quais estão envolvidos e os mecanismos pelos quais se levam a cabo (Neves-Ferreira *et al.*, 2010).

Dentre as características que tem em comum os SVMPIs até agora identificados estão as seguintes: são glicoproteínas de caráter ácido, termoestáveis e funcionais em uma ampla faixa de pH, com pontos isoelétricos entre <3,5 e 5,4, que podem ter massa molecular na faixa de 40 a 95 kDa, ou na faixa de 700 a 1090 kDa, sendo mais abundantes os de baixa massa molecular. Os SVMPIs podem ser encontrados como monômeros ou dímeros, sendo

exceção o *Erinacin* (fator anti-hemorrágico presente no músculo do ouriço *Erinaceus europaeus*). São proteínas que não possuem atividade proteolítica, sendo que, a inibição que produzem sobre as SVMPs, deve-se à formação de ligações não covalentes. Além disso, todos estes SVMPIs, estão disponíveis como fatores circulantes no sangue (ou presentes no músculo), inibindo a atividade hemorrágica das SVMPs e das peçonhas de serpentes conferindo proteção ao inibir ou reduzir os efeitos deletérios destas (Domont *et al.*, 1991; Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Perales *et al.*, 2005; Neves-Ferreira *et al.*, 2010; Biardi *et al.*, 2011; Voss e Jansa, 2012).

Assim mesmo, esses SVMPIs apresentam homologia com diferentes famílias de proteínas segundo o qual podem ser classificados em: família supergen das imunoglobulinas, família ficolina/opsonina p35 e superfamília das cistatinas. Sendo que, nas duas primeiras famílias tem sido classificados SVMPIs identificados em pequenos mamíferos, e todos os SVMPIs identificados em serpentes pertencem ao último grupo. Porém, cabe ressaltar que ainda vários SVMPIs que já foram identificados e/ou isolados, não foram classificados em nenhuma destas famílias devido a que são necessárias maiores caracterizações estruturais (Perales *et al.*, 2005; Neves-Ferreira *et al.*, 2010).

À superfamília das cistatinas pertencem os inibidores proteicos de cisteíno proteases, que pela sua sequência de aminoácidos apresentaram homologia com a ovocistatina da galinha (*Gallus gallus*). Esses inibidores foram classificados em quatro tipos levando em conta os seguintes critérios: presença de uma, duas ou três cópias de segmentos tipo-cistatina e a presença ou ausência de pontes dissulfeto (Rawlings e Barrett, 1990). Porém, devido a que os SVMPIs não inibem as cisteíno proteases, se não que são proteínas cistatina–símile e, a que conforme passa o tempo podem ser obtidas maiores informações que permitem propor classificações mais refinadas, Rawling et al. (2014) propuseram uma nova diversificação desta superfamília onde ela passaria a ser o clã IH, dividido nas subfamílias I25A, I25B e I25C, ficando classificados nesta última subfamília os SVMPIs e

outras proteínas do tipo cisteíno – símile que não apresentam a atividade inibitória proteica sobre as cisteíno proteases (Rawlings *et al.*, 2004; Rawlings *et al.*, 2014).

1.6 Complementação à soroterapia

Desde o século XIX começou a se desenvolver a soroterapia como tratamento efetivo para várias doenças. Neste sentido, foram Albert Calmete e Vital Brazil os pioneiros no uso de soro obtido a partir do sangue de cavalos hiperimunizados previamente com peçonha de serpente como tratamento efetivo para os acidentes ofídicos (Warrell *et al.*, 2007; WHO, 2010). Sendo que atualmente continua a ser a soroterapia a única terapia reconhecida, validada e aprovada para o tratamento dos acidentes ofídicos (Kasturiratne *et al.*, 2008; Queiroz *et al.*, 2008; Sanchez e Rodriguez-Acosta, 2008; Cruz *et al.*, 2009; Calvete *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010a; Gutiérrez *et al.*, 2011; Vasquez *et al.*, 2013; Gutiérrez, 2014).

A soroterapia consiste na purificação de imunoglobulinas (IgG) pelo fracionamento com sulfato de amônio ou ácido caprílico do soro obtido de cavalos e/ou outros animais de grande porte (ovelhas, camelos, etc.), previamente imunizados com a peçonha de serpente, para a sua administração após um acidente ofídico (Borges *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2011). A partir destas IgG também podem ser obtidos e utilizados na soroterapia dois produtos enzimáticos, os fragmentos bivalentes $F(ab')_2$ obtidos pela digestão com pepsina e fracionamento com sulfato de amônio, e os fragmentos monovalentes Fab como resultado da digestão com papaína e o fracionamento com sulfato de amônio (Gutiérrez *et al.*, 2010a; Gutiérrez *et al.*, 2011).

No caso do soro antiofídico utilizado no tratamento do acidente ofídico botrópico, este é produzido a partir da imunização dos cavalos com um *pool* de peçonhas provenientes de seis espécies do gênero *Bothrops* (Queiroz *et al.*, 2008). Porém a variabilidade intra - espécie da peçonha, especialmente nas espécies que tem uma distribuição geográfica muito ampla, assim como a variabilidade inter – espécie, podem conduzir a dificuldades no momento da escolha das peçonhas utilizadas no *pool*, e portanto à obtenção de um soro

antiofídico que pode se mostrar pouco eficaz no tratamento (Chippaux *et al.*, 1991; da Silva *et al.*, 2007b; Sanchez e Rodriguez-Acosta, 2008).

Porém, mesmo sendo a soroterapia a pedra angular no tratamento dos acidentes ofídicos, existem alguns aspectos que tem dificultado obter maior sucesso no manejo deste agravo à saúde. Um deles é o atraso na administração da soroterapia depois da ocorrência do acidente ofídico, pois a efetividade desta é muito alta quando é rápida e corretamente administrada, o qual é grave devido a que o tempo de tratamento depois do acidente ofídico é fator determinante e crítico para o sucesso na neutralização dos efeitos decorrentes do envenenamento (Chaves *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2009; Kemparaju *et al.*, 2010).

Este atraso na administração da soroterapia é o resultado de vários fatores que refletem a complexidade do problema que representam os negligenciados acidentes ofídicos, entre eles, a escassez dos soros antiofídicos, não estando disponíveis em muitas áreas rurais a nível mundial, incluído o Brasil e, a dificuldade no transporte nas áreas rurais distantes para ter acesso aos serviços de saúde que, além de tudo, estão pouco desenvolvidos nos países mais atingidos pelo problema (Cruz *et al.*, 2009; Strauch *et al.*, 2013). Essa escassez dos soros antiofídicos deve-se a que a produção mundial está abaixo das necessidades como resultado do estado negligenciado destes acidentes, a subestimação dos dados epidemiológicos, a que sua produção além de ser cara e complexa precisa de uma escolha certa no *pool* das peçonhas a ser utilizadas para a imunização, a que existe um número pequeno de produtores e, a que a fragilidade do processo produção – distribuição coloca em risco a disponibilidade e eficácia do soros antiofídicos (Warrell *et al.*, 2007; WHO, 2010).

Além disto, não é recomendável a administração da soroterapia fora do hospital, devido a que o paciente deve estar sob observação constante, pelo menos durante as primeiras 24 horas, já que as reações adversas por hipersensibilidade são frequentes (doença do soro, choque anafilático) e não podem ser detectadas pelas provas de sensibilidade e, a que em geral, a administração da soro antiofídico é acompanhada de outras intervenções como a

manutenção de fluidos eletrólitos e a vigilância de outros parâmetros fisiológicos (Martz, 1992; Cruz *et al.*, 2009).

Isto, combinado com a antes mencionada dificuldade no acesso oportuno aos serviços de saúde, como a dificuldade de uma rápida e eficiente neutralização local pelos anticorpos (IgG, $F(ab')_2$ e/ou Fab), devido às diferenças dinâmicas e cinéticas entre esses e os componentes da peçonha e, com o rápido desenvolvimento dos efeitos locais produzidos pela ação das toxinas da peçonha, fazem com que os drásticos efeitos locais do envenenamento, que no caso do acidente botrópico estão associados a incapacidade permanente pela perda ou atrofia do membro atingido, não sejam neutralizados ou reduzidos pela soroterapia (Borges *et al.*, 2000; Gutiérrez e Rucavado, 2000; Otero *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2007b; Baldo *et al.*, 2010; Strauch *et al.*, 2013; Vasquez *et al.*, 2013).

Por último, mais um fator relevante respeito ao soro antiofídico é a sua segurança, por se tratar de um produto de origem biológico heterólogo, deve-se garantir que está livre de contaminante como pirógenos e que é estéril, assim mesmo, também demanda condições específicas de transporte e armazenamento para preservar a sua estabilidade e eficácia e, mesmo sendo este último fator consideravelmente simplificado se o soro é liofilizado, este não é um processo comumente praticado pelos produtores do soro antiofídico (Gutiérrez *et al.*, 2006).

Entretanto, apesar das desvantagens e inconvenientes da soroterapia é inegável o sucesso que em geral ela tem, mesmo assim é importante levar na conta que cada dia é maior o conhecimento que se tem sobre a composição da peçonha, sendo possível direcionar este conhecimento na busca de terapias toxino - dirigidas mais eficientes (Calvete *et al.*, 2010), pesquisando sobre novos inibidores tanto naturais quanto sintéticos, que posam ser utilizados como complementação da soroterapia, especialmente no que se refere à neutralização dos drásticos efeitos locais do acidente ofídico botrópico, nos quais as metaloproteases desempenham um papel fundamental na fisiopatologia resultante desse

tipo de acidente (Borges *et al.*, 2000; Gutiérrez e Rucavado, 2000; Biondo *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2007a; Sanchez e Rodriguez-Acosta, 2008; Asega *et al.*, 2014).

Experimentalmente tem sido demonstrado que a neutralização dos efeitos locais com estes SVMPIs é até seis vezes mais efetiva do que a neutralização dos mesmos com o soro antiofídico (Neves-Ferreira *et al.*, 1997), de modo que, estes SVMPIs tem alto potencial para serem desenvolvidos como coadjuvantes à soroterapia, mediante sua administração local para a neutralização dos drásticos efeitos locais (Perales *et al.*, 2005; Baldo *et al.*, 2010). Assim mesmo, os SVMPIs, podem ser explorados como ferramentas muito úteis nos estudos dos mecanismos moleculares tanto das SVMPs com seus alvos, como das metaloproteases que estão amplamente distribuídas nos organismos, e por vezes envolvidas em diferentes patologias (Perez e Sanchez, 1999; Milward *et al.*, 2007; Asega *et al.*, 2014).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a purificação e a caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de metaloproteases a partir do soro da serpente *Bothrops alternatus* (BaltMPI).

2.2 Objetivos Específicos

- Purificar um inibidor de metaloproteases a partir do soro da serpente *Bothrops alternatus* (BaltMPI);
- Caracterizar bioquimicamente o inibidor mediante a determinação da sua massa molecular relativa, ponto isoelétrico e o sequenciamento N-terminal;
- Caracterizar funcionalmente o inibidor mediante a inibição da atividade hemorrágica e proteolítica da Batroxase, uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops atrox*;
- Avaliar a especificidade do inibidor mediante a inibição da atividade proteolítica, sobre o fibrinogênio, da Batroxase (metaloprotease de *Bothrops atrox*) e da BjSP (serinoprotease de *Bothrops jararaca*);
- Avaliar a estabilidade do inibidor;
- Estudar a complexação entre o inibidor e a Batroxase;
- Avaliar o potencial do inibidor como complemento da soroterapia.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Soro da serpente *Bothrops alternatus*

O soro da serpente *Bothrops alternatus* foi doado pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) – Campus Botucatu, sob a responsabilidade do Dr. Benedito Barraviera e do Dr. Rui Seabra Junior; e pelo Serpentário da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade do Professor Dr. Eduardo Brandt de Oliveira.

3.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (18-20g), fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para avaliação da inibição da atividade hemorrágica da Batroxase. Os experimentos com animais foram realizados segundo as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e teve a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo mediante Protocolo N º 12.1.231.53.7 (Anexo 1).

3.1.3 Peçonha

A peçonha bruta cristalizada da serpente *Bothrops atrox* foi adquirida do Centro de Extração de Toxinas Animais – CETA (Morungaba – SP).

3.1.4 Proteases

A BjussuMP-I, metaloprotease da classe P-III presente na peçonha de *Bothrops atrox*, e a BjSP, serinoprotease presente na peçonha de *Bothrops jararaca*, foram isoladas no laboratório de toxinologia da Professora Suely Vilela, seguindo a metodologia descrita por Mazzi *et al.* (2004) e por Carone *et al.* (2013), respectivamente.

3.1.5 Reagentes e outros materiais

Os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água utilizada em todos os experimentos foi água deionizada obtida em sistema de purificação MilliQ® (Miillipore). Os demais materiais e equipamentos estão descritos a seguir, nas metodologias.

3.2 Metodologia

3.2.1 Obtenção do soro

As serpentes *Bothrops alternatus* foram contidas com auxílio de um tubo de polipropileno e o sangue coletado por meio de punção na veia caudal, logo após a cloaca. Cerca de 2 mL de sangue foram coletados de cada animal em seringa estéril sem anticoagulante e acondicionados em microtubos estéreis. Após cada coleta estes microtubos foram deixados a temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. Em seguida, a parte líquida foi transferida para tubos de centrífuga (Marca Heal Force, modelo Neofuge13R), e centrifugados a 3000x*g* por 15 minutos. O soro obtido foi liofilizado e armazenado a -20°C.

3.2.2 Isolamento da Batroxase, metaloprotease presente na peçonha da serpente *Bothrops atrox*

A Batroxase, uma metaloprotease hemorrágica da classe PI, foi isolada da peçonha da serpente *Bothrops atrox* através de três passos cromatográficos, adaptando a metodologia realizada por Cintra *et al.* (2012): cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S200 (100cm x 2,6cm), cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex™ 75 (10/300 GL) e cromatografia de troca iônica em coluna Shodex ES-502N 7C.

3.2.2.1 Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S200

Cerca de 300mg de peçonha bruta cristalizada de *Bothrops atrox*, foram dissolvidos em 5,0mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05M pH 8,0 e centrifugados a 11.200x*g*

por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi aplicado à coluna Sephacryl S200 (100cm x 2,6cm), previamente equilibrada com a mesma solução tampão utilizada para dissolver a amostra. A eluição foi feita com um fluxo de 21,0mL/h, e foram coletadas frações de 3mL/tubo, monitoradas em espectrofotômetro Beckman DU® 640 (Beckman Coulter, Brasil) a um comprimento de onda de 280nm, e os valores obtidos foram plotados no programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção do perfil cromatográfico. As frações foram reunidas e liofilizadas em *pools* segundo os picos de absorbância formados. Todos os *pools* foram submetidos à determinação da atividade hemorrágica e SDS-PAGE e o *pool* de interesse foi submetido ao próximo passo cromatográfico.

3.2.2.2 Cromatografia de exclusão molecular em Superdex™ 75

Cerca de 12mg do *pool* com a metaloprotease de interesse foram dissolvidos em 500μL de AMBIC 0,05M pH 8,0 e centrifugados a 11.200x*g* por 10 minutos. A amostra foi aplicada à coluna Superdex™ 75 10/300 GL (GE *Healthcare Life Sciences*), utilizando o sistema FPLC (*Fast protein liquid chromatography*, ÄKTAFPLC, GE *Healthcare Life Sciences*), previamente equilibrada com a mesma solução tampão utilizada para dissolver a amostra. A eluição foi feita com fluxo de 0,40mL/min, e foram coletadas frações de 3mL/tubo. Durante o procedimento foi registrada a absorbância das frações coletadas a 280nm, e os valores obtidos foram plotados no programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção do perfil cromatográfico. As frações foram reunidas e liofilizadas em *pools* segundo a sua absorbância. Todos os *pools* obtidos foram avaliados por eletroforese em SDS-PAGE. O *pool* de interesse foi submetido a um terceiro passo cromatográfico.

3.2.2.3 Cromatografia de troca iônica em coluna ES-502N 7C

Cerca de 6,0mg do pool de interesse foram dissolvidos em 500μL de AMBIC 0,05M pH 7,4. Após centrifugação a 11.200x*g* por 10 minutos, o sobrenadante foi aplicado à coluna Asahipak ES-502N 7C (Shodex™, Showa Denko America, Inc), utilizando o sistema HPLC

(*High performance liquid chromatography*, SHIMADZU). A fase móvel consistiu em um tampão A: bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05M e tampão B: AMBIC 0,5M, ambos de pH 7,4. A cromatografia foi realizada em gradiente fracionado: 0% de B nos primeiros 40 minutos, de 0 até 50% de B até completar 120 minutos de corrida, de 51 até 100% de B até 180 minutos de corrida, permanecendo em 100% de B nos seguintes 40 minutos. O fluxo durante a cromatografia foi de 0,5mL/min. A absorbância das frações foi registrada a 280nm, mediante detector SPD 10AV-vp (SHIMADZU), e os valores obtidos foram plotados no programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção do perfil cromatográfico. As frações coletadas foram liofilizadas e submetidas a SDS-PAGE e a determinação da atividade hemorrágica.

3.2.2.4 Cromatografia em fase reversa em coluna CLC-ODS C18

Uma amostra da fração, contendo a Batroxase, foi dissolvida em 500μL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (Tampão A), e aplicada na coluna CLC-ODS C18 (SHIMADZU) previamente equilibrada com o mesmo tampão, utilizando o sistema HPLC (*High performance liquid chromatography*, SHIMADZU), e os valores obtidos foram plotados no programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção do perfil cromatográfico. A eluição foi realizada com o tampão A e o tampão B (solução de acetonitrila (ACN) 70% e TFA 0,1%) em gradiente fracionado: 0% de B de 0 a 5 minutos, de 0 a 100% de B até 60 minutos, mantendo essa concentração até o minuto 70, em fluxo de 1mL/min. A absorbância foi registrada a 280nm, mediante detector SPD 10AV-vp (SHIMADZU).

3.2.3 Purificação do inibidor sérico de metaloproteases

O fracionamento do soro para a obtenção do inibidor, após determinar seu potencial mediante a atividade de inibição hemorrágica, foi realizado mediante quatro cromatografias em sequência: Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose™ Fast Flow (GE *Healthcare Life Sciences*), cromatografia de exclusão molecular em Superdex™ 200 10/300 GL (GE *Healthcare Life Sciences*), cromatografia de troca iônica em MonoQ™ 5/50 GL (GE

Healthcare Life Sciences), e cromatografia em fase reversa em coluna CLC-ODS C18 (SHIMADZU).

As frações obtidas em todas as cromatografias foram avaliadas quanto à atividade hemorrágica, para determinar a presença do inibidor, e SDS-PAGE, para avaliação do seu grau de pureza.

3.2.3.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose™ Fast Flow

Foram dissolvidos 50mg de soro liofilizado da serpente *Bothrops alternatus*, em 2,0mL de tampão AMBIC 0,05M pH 8,0 (Tampão A) e centrifugados a 10000x*g* por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi aplicado à uma coluna XK 26/20 (200mm x 26mm) contendo resina DEAE Sepharose™ Fast Flow (GE *Healthcare Life Sciences*), previamente equilibrada com o mesmo tampão, utilizando o sistema FPLC (*Fast protein liquid chromatography*, ÄKTAFPLC, GE *Healthcare Life Sciences*). A eluição foi feita com fluxo de 0,5mL/min, utilizando AMBIC 1,0M pH 8,0 como tampão B, com gradiente segmentado: 0% de B de 0 até 220 minutos, de 0 a 70% de B até 920 minutos, finalizando com um *step* a 100% de B até 970 minutos. A absorbância das frações foi monitorada a 280nm, e os dados plotados no programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção do perfil cromatográfico, segundo o qual foram formados *pools* dos picos eluídos. Esses pools foram liofilizados e submetidos á avaliação por SDS - PAGE e atividade hemorrágica. A fração cromatográfica que apresentou inibição da atividade hemorrágica foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em Superdex™ 200.

3.2.3.2 Cromatografia de exclusão molecular em Superdex™ 200

Da fração obtida na cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose™ e que apresentou inibição da atividade hemorrágica da Batroxase, foram diluídos 10mg em 4,0mL de AMBIC 0,05M pH 8,0. Essa amostra foi centrifugada a 10.000x*g* por 10 minutos, e em seguida 500µL foram aplicados à coluna Superdex™ 200 10/300 GL (GE *Healthcare Life*

Sciences) utilizando o sistema FPLC (*Fast protein liquid chromatography*, ÄKTAFPLC, GE *Healthcare Life Sciences*). O fluxo durante a corrida foi de 0,25mL/min, sendo coletadas frações de 500µL/tubo. A absorbância foi registrada a 280nm, e os dados plotados no programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção do perfil cromatográfico, segundo o qual foram formados *pools* dos picos eluídos. Esses pools foram liofilizados e submetidos á avaliação por SDS - PAGE e atividade hemorrágica. A fração cromatográfica que apresentou inibição da atividade hemorrágica foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ™ 5/50 GL.

3.2.3.3 Cromatografia de troca iônica em MonoQ™ 5/50 GL

Da fração obtida na cromatografia de exclusão molecular Superdex™ 200 e que apresentou inibição da atividade hemorrágica da Batroxase, foram diluídos 4,5mg em 1,5mL de AMBIC 0,05M pH 8,0 (Tampão A). Posteriormente a amostra foi centrifugada a 10000x*g* por 10 minutos e em seguida 500µL da amostra foram aplicados à coluna MonoQ™ 5/50 GL (GE *Healthcare Life Sciences*) utilizando o sistema FPLC (*Fast protein liquid chromatography*, ÄKTAFPLC, GE *Healthcare Life Sciences*). A eluição foi realizada no fluxo de 0,50mL/min com gradiente linear de 0 a 100% de tampão B (AMBIC 1,0M pH 8,0) em 120 volumes de coluna, sendo coletadas frações de 2,0mL/tubo. A absorbância foi registrada a 280nm, e os dados plotados no programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção do perfil cromatográfico, segundo o qual foram formados *pools* dos picos eluídos. Esses pools foram liofilizados e submetidos à avaliação por SDS - PAGE e atividade hemorrágica. A fração cromatográfica que apresentou inibição da atividade hemorrágica foi submetida à cromatografia em fase reversa em coluna CLC-ODS C18.

3.2.3.4 Cromatografia em fase reversa em CLC – ODS C18

Da fração obtida na cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ™ e que apresentou inibição da atividade hemorrágica da Batroxase, foram diluídos 1mg em 1,5mL

de Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,1% (Tampão A), e posteriormente centrifugados a 10000x*g* por 10 minutos. Em seguida 500µL da amostra foram aplicados à coluna CLC-ODS C18 (SHIMADZU) previamente equilibrada com o mesmo tampão, utilizando o sistema HPLC (*High performance liquid chromatography*, SHIMADZU). A eluição foi realizada com o tampão A e o tampão B (solução de ACN 70% e TFA 0,1%) em gradiente linear de 0% a 100% de B em 55 minutos, em fluxo de 1mL/min. A absorbância foi registrada a 280nm, mediante detector SPD 10AV-vp (SHIMADZU), e os dados plotados no programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção do perfil cromatográfico, segundo o qual foram formados *pools* dos picos eluídos. Esses *pools* foram liofilizados e submetidos á avaliação por SDS - PAGE e atividade hemorrágica.

Quando realizada esta cromatografia em fase reversa para a avaliação do grau de pureza, foram utilizados os tampões TFA 0,1% (A) e ACN 70% + TFA 0,1% (B), em gradiente linear de 5 a 95% de B em 30 minutos e fluxo de 1mL/min, e realizado o monitoramento das frações a 280nm.

3.2.4 Determinação de proteínas

A determinação das proteínas foi realizada utilizando o método descrito por Scopes (1974).

3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% foi realizada em condições desnaturantes em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), segundo metodologia previamente descrita Laemmli (1970). Quando a eletroforese foi feita em condições redutoras foi utilizado β - mercaptoetanol.

Em cada gel foi utilizado padrão de massas moleculares da Thermo (# 26610) com uma faixa de massas moleculares de 14,4 a 116,0 kDa. A corrida do gel foi feita a 120V e 12 mA.

A coloração foi realizada com Azul de Coomassie G-250 0,1% (m/v) dissolvido em água, metanol e ácido acético (40:50:10 v/v). Os géis foram descorados pela troca sucessiva de uma solução de ácido acético glacial 10% e etanol 5% (v/v).

As proteínas de referência do padrão da Thermo correspondem a: β-galactosidase (116,0 kDa), Albumina de soro bovino (66,2 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Lactato desidrogenasse (35,0kDa), REase Bsp98I (25,0kDa), β-lactoglobulina (18,4kDa) e lysozyme (14,4kDa).

3.2.6 Focalização Isoelétrica

A focalização isoelétrica foi determinada adaptando o método descrito por Vesterberg (1972). Inicialmente as placas foram tratadas com as soluções *Bind silane* e *Repel silane* (GE *Healthcare Life Sciences*) conforme as indicações do provedor. Após isto, foi preparado o gel a 7,5% (m/v) em poliacrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 5%C), contendo 10% (m/v) de sacarose, 2% (v/v) de anfólito pH 3,0-10,0 (Pharmalyte, GE catálogo 17 0456 01), 0,17% (v/v) de TEMED (N',N',N',N' – tetrametiletilenodiamina) e 0,075% (m/v) de persulfato de amônio. A solução a ser polimerizada foi adicionada a um sistema constituído por uma placa fina de vidro de 18 x 11 cm, montada entre duas placas grossas do mesmo tamanho fixadas por meio de pinças metálicas. Após a polimerização do gel, as placas grossas foram retiradas e a placa fina foi usada como suporte para o gel, que é então colocado sobre uma placa de porcelana refrigerada ligada a um banho termostatizado a 10°C (sistema MultiphorTM II, GE Healthcare). Duas tiras de papel foram utilizadas para conectar o gel e os eletrodos de platina, sendo o cátodo embebido em uma solução de hidróxido de sódio 1 M e o ânodo em ácido fosfórico 1 M. Os eletrodos de platina foram centralizados sobre as tiras de papel e o sistema foi então fechado. A fonte de alta voltagem (modelo Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, GE Healthcare) foi ajustada para valores de 2000 V, 20 mA e 500 V.h para a realização de uma pré-focalização por 30 minutos. Em seguida, as amostras (10 µL) foram aplicadas diretamente no gel com a utilização de um

pente e a focalização prosseguiu por aproximadamente 4 horas a 2000 V, 20 mA e 3000 V.h. Padrão de focalização isoelétrica (IEF Standards #161-0310 – *BIO-RAD*) foi corrido em paralelo às amostras nas mesmas condições. Sendo este padrão composto por nove proteínas de pI conhecido na faixa de 4,45 – 9,6: ficocianina, β-lactoglobulina B, anidrase carbônica humana e bovina, mioglobina equina, hemoglobina humana A e C, lentil lectina e citocromo C.

Após a focalização isoelétrica, desprezou-se 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. Desta forma foi possível construir uma curva de pH versus distância de migração no gel para o cálculo do pI das amostras. O restante do gel contendo as amostras foi fixado em solução de ácido tricloroacético a 20% (m/v) por 30 minutos e, após sucessivas lavagens com água Milli-Q, foi corado com azul de Coomassie G-250 0,1% (m/v) dissolvido em água Milli-Q: metanol: ácido acético (40:50:10, v/v) e descorado em solução de ácido acético 10% e metanol 5%.

3.2.7 Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica da Batroxase foi avaliada adaptando a metodologia descrita por Kondo *et al.* (1960). Nesta avaliação a Batroxase foi dissolvida em 50μL de PBS (Tampão fosfato-salino) e injetada, por via intradérmica, no dorso de camundongos *Swiss,* fêmeas, de 18 a 22 g, previamente anestesiados com 20μL de uma solução de xilamina/ketamina (1:1). Como controle negativo foi utilizado PBS (50μL). Após um período de 2 horas, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO_2, as peles do dorso dos animais removidas e os halos hemorrágicos registrados fotograficamente.

3.2.7.1 Inibição da atividade hemorrágica

A inibição da atividade hemorrágica foi avaliada adaptando a metodologia descrita por Kondo *et al.* (1960). Nesta determinação, diferentes quantidades do inibidor, ou das frações resultantes das cromatografias, foram previamente incubadas com Batroxase por 30 minutos a 37 ºC. Tanto o controle negativo (PBS) quanto o controle positivo (Batroxase) foram tratados nas mesmas condições. Após a incubação, as amostras foram injetadas no dorso de camundongos *Swiss,* fêmeas, de 18 a 22 g, previamente anestesiados com 20μL de solução de xilamina/ketamina (1:1). Após 2 horas os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO_2 e as peles do dorso dos animais removidas para avaliação do grau de inibição da atividade hemorrágica.

Na construção da curva concentração – resposta para a determinação da Dose Inibitória Hemorrágica Mínima (DIHM) foram utilizadas as seguintes concentrações do inibidor: 0,1; 0,5; 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 12,5μg. Os ensaios foram feitos em duplicata. A DIHM foi definida como a mínima quantidade do inibidor necessária para inibir completamente a atividade da metaloprotease em sua Dose Hemorrágica Mínima (DHM), que é definida como a mínima quantidade de proteína necessária para produzir um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro em duas horas (Otero *et al.*, 1992).

3.2.7.2 Avaliação do potencial inibitório sem incubação prévia

A avaliação da inibição da atividade hemorrágica produzida pela Batroxase foi realizada como descrito no item 3.2.7.1, tendo como única modificação a não realização do passo da incubação previa entre o inibidor e a metaloprotease e, portanto, sendo injetadas as amostras nos camundongos assim que preparadas.

3.2.7.3 Avaliação do potencial do inibidor como complemento à soroterapia

A avaliação da inibição produzida pelo inibidor BaltMPI sobre a atividade hemorrágica da Batroxase, foi realizada em duplicata como descrito no item 3.2.7, injetando-se no dorso dos camundongos uma DIHM do BaltMPI após 0 e 10 minutos da injeção da Batroxase.

3.2.7.4 Avaliação do potencial do inibidor sobre SVMPs P-III

A avaliação da inibição produzida pelo soro da serpente *Bothrops alternatus* e o inibidor BaltMPI sobre a atividade hemorrágica da BjussuMP-I, uma metaloprotease da classe P-III isolada a partir da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, foi realizada em duplicata como descrito no item 3.2.7.1.

3.2.8 Avaliação da estabilidade do BaltMPI

A avaliação da estabilidade do inibidor BaltMPI foi realizada mediante a inibição da atividade hemorrágica da Batroxase como descrito no item 3.2.7.1 após o inibidor BaltMPI ter sido submetido a diferentes condições de temperatura e pH por um período de 30 minutos. As condições avaliadas foram: -80, -20, 4, 60 e 100°C de temperatura e pH de 1,0 (TFA 0,1%), 5,0 (Acetato de sódio 0,5M), 8,0 (Fosfato de sódio 0,1M), e 9,0 (Tris – HCl 0,5M). As condições de 37°C de temperatura e 7,4 de pH, foram tidas como controle da atividade, realizando o controle positivo com a .Batroxase e o controle da inibição sobre esta com o BaltMPI.

3.2.9 Inibição da atividade fibrinogenolítica

A inibição da atividade fibrinogenolítica foi avaliada adaptando as modificações feitas por Rodrigues (2000) sobre a metodologia descrita por Edgar e Prentice (1973).

Amostras contendo 50 µg de fibrinogênio bovino em água Milli-Q foram incubadas com diferentes doses das enzimas a 37°C por 1h. A reação foi interrompida por adição de 10 µL de tampão desnaturante composto de Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 10% (v/v), SDS 2% (v/v) e azul de bromofenol 0,05% (m/v), seguido de fervura a 100ºC durante 5 minutos. As amostras foram então analisadas por SDS-PAGE a 12% (item 3.2.5.). A inibição da atividade proteolítica das enzimas sobre o fibrinogênio bovino na presença de inibidores específicos (BaltMPI e EDTA) foi avaliada após pré-incubação das enzimas com os inibidores por 30 minutos a 37°C.

3.2.10 Inibição da atividade fibrinolítica

A inibição da atividade fibrinolítica foi avaliada em placa de Petri adaptando o método descrito por Jespersen e Astrup (1983), e as modificações de Leitão *et al.* (2000). Foram utilizadas soluções de fibrinogênio bovino 0,3% (m/v) e agarose 0,76% (m/v) preparadas em tampão barbital sódico 40 mM pH 7,8, contendo CaCl2 2,10 mM, MgCl2 1,0 mM e NaCl 95 mM. A solução de agarose foi aquecida em placa de aquecimento até a formação de um coloide transparente e após resfriamento até 40ºC, adicionou-se a solução de fibrinogênio na proporção de 1:1 (v/v). A esta mistura foram adicionados 100 µL de solução de trombina (1 µg/µL), vertendo o conteúdo em placas de Petri plásticas (85 x 10 mm) para a formação do coágulo de fibrina. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 60 minutos e em seguida foram feitos orifícios de 5 mm de diâmetro para aplicação das amostras (30µL). Após a aplicação das amostras as placas foram incubadas por 18 h a 37°C. A análise foi feita visualmente e quantificada pela medida do diâmetro em milímetros dos halos de lises produzidos, comparando-se com um controle positivo (Plasmina 1µg/µL) e um controle negativo (PBS). A inibição da atividade proteolítica da Batroxase sobre a fibrina na presença do BaltMPI foi avaliada após pré-incubação das enzima com o inibidor por 30 minutos a 37°C.

3.2.11 Inibição da atividade proteolítica sobre azocaseína

A inibição da atividade proteolítica foi avaliada adaptando protocolo descrito por. Siigur *et al.* (1998). Foram adicionados 10 μg de Batroxase a 1 mL de solução de azocaseína (1 mg/mL) em 0,2 M Tris – HCl 0,5 M, CaCl2 4mM pH 7,6 e incubadas a 37 °C por 60 minutos. Em seguida foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 80% (m/v) para precipitar a azocaseína não degradada. Após 10 minutos as soluções foram centrifugadas por 10 minutos a 10000x*g* e a absorbância do filtrado medido em comprimento de onda de 366 nm em espectrofotômetro Beckman DU® 640 (Beckman Coulter, Brasil). Uma unidade de atividade foi definida como um aumento de 0,01 unidades de absorbância a 366 nm, expressando os resultados como atividade específica (U/mg). A inibição da atividade proteolítica da Batroxase sobre a azocaseína na presença do BaltMPI foi avaliada após pré-incubação da enzima (10μg) com o inibidor (2,5, 5,0, 10, 15 e 20 μg) por 30 minutos a 37°C. EDTA (20mM) foi utilizado como controle da inibição sobre a Batroxase..

3.2.12 Determinação da massa molecular

A massa molecular do inibidor foi determinada por SDS - PAGE e espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo (MALDI/TOF/TOF MS).

3.2.12.1 Determinação da massa molecular por SDS – PAGE

A SDS – PAGE do inibidor foi realizada conforme descrito no item 3.2.5. A massa molecular do inibidor de proteases foi estimada pela interpolação da sua migração relativa no gel em uma curva linear logarítmica da massa molecular das proteínas do padrão molecular versus a distância de migração relativa de cada proteína no gel.

3.2.12.2 Determinação por espectrometria de massas MALDI/TOF/TOF MS

A massa molecular do inibidor foi determinada em espectrômetro de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) tipo duplo TOF (*Time of flight*) (MALDI/TOF/TOF MS, modelo AXIMA Performance, Shimadzu Biotech, Manchester, UK), no modo linear positivo, e o espectrômetro foi calibrado com padrões de proteína incluindo BSA, insulina, citocromo C, ribonuclease, apomioglobina e aldolase. As amostras foram diluídas em 50uL de água Milli-Q e misturadas na proporção de 1:1 com a matriz composta de ácido sinapínico (10mg/mL) em ACN 50% e TFA 0,1%, e aplicadas na placa do MALDI. A faixa de massas moleculares avaliada foi de 3.000 – 100.000m/z.

Esta determinação foi realizada no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto em colaboração com o Professor Dr. José César Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.2.13 Complexação BaltMPI – Batroxase

A avaliação da complexação entre o BaltMPI e a Batroxase foi realizada adaptando o método descrito por Neves-Ferreira et al. (1997). Foram incubados por 30 minutos a 37°C 10 μg de Batroxase e 5 μg de BaltMPI. Em seguida foram analisadas as amostras por SDS - PAGE sem β-mercaptoetanol, como descrito no item 3.2.5.

3.2.14 Sequenciamento N-terminal

O sequenciamento da região N-terminal do inibidor BaltMPI foi obtido pelo sequênciamento proteico de acordo com o método de degradação de Edman (Edman e Begg, 1967), que consiste em três etapas: acoplamento, clivagem e conversão. Após os procedimentos de purificação, a proteína foi aplicada diretamente em uma membrana de

fibra de vidro (Wako, Japão), na concentração final de 200 pmol. A partir daí, o Sequênciador Automático de Proteínas da marca Shimadzu (Sistema PPSQ-33A) procedeu à análise da estrutura primária da enzima. O aminoácido derivado da reação com o fenilisotiocianato (PITC) foi convertido a feniltiohidantoína (PTH)-aminoácido que foi então cromatograficamente separado em RP-HPLC. A quantificação e identificação das amostras foram realizadas através da comparação com padrão de 25 pmol analisado no início do sequênciamento. Este experimento foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Eliane C. Arantes Braga da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.2.15 Determinação do grau de homologia por espectrometria de massas ESI-QUAD/TOF

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

Os peptídeos trípticos da amostra foram preparados em coluna ZipTip contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol e equilibrada com ácido fórmico a 0,2%. A amostra foi carregada na coluna e purificada de sais e outros componentes hidrofílicos por 3 lavagens com 100 µL de ácido fórmico a 0,2%, sendo os peptídeos eluídos da resina com 30 µL de uma solução de

metanol 60% em ácido fórmico 5%. Neste solvente, a amostra foi diretamente analisada por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI MS).

Os peptídeos trípticos foram analisados em espectrômetro de massas tipo eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) utilizando uma origem eletrospray do tipo nanoflow contendo um capilar de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno, mantido a 4 kVolts e 40 V no cone de entrada e a uma temperatura de 100°C. A amostra foi introduzida por uma bomba tipo seringa (Harvard, Inc, USA) a um fluxo de 300 nL/min e os espectros de massa foram coletados na forma de média de scans (15-30 scans) e processados com o software MassLynx v. 3.3 (Micromass, Manchester, UK). A coleta de dados de massa utilizou varredura em MS1 (400-1500 u.m.a) obtendo-se assim a determinação da massa dos peptídeos (peptide mass fingerprint). Cada íon de peptídeo detectado foi submetido a CID-MS/MS (daughter ion scanning) que promove a fragmentação do íon selecionado por colisão com argônio na pressão parcial de 3,0 x 10-3 mBar e energia variando entre 20-30 eV, originando fragmentos de íons do tipo b e y que foram utilizados para a dedução das respectivas sequências de aminoácidos dos peptídeos pelo programa Biolynx (Micromass, Manchester, UK).

Esta determinação foi realizada no Centro de Química de Proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto em colaboração com o Professor Dr. José César Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.2.16 Alinhamento das sequências homólogas

As sequências homólogas ao inibidor BaltMPI foram obtidas a partir do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; www.ncbi.nlm.nih.gov), sendo que o alinhamento entre as sequências foi feito utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), e a ferramenta COBALT (*Constraint-based Multiple Alignment Tool*).

3.2.17 Análise estatística

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

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento da metaloprotease presente na peçonha da serpente *Bothrops atrox*

A Batroxase, metaloprotease da classe PI, foi isolada a partir da peçonha da serpente *Bothrops atrox* mediante três passos cromatográficos. No primeiro passo 300mg da peçonha foram submetidos a cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-200, obtendo onze frações: S200 Ia, S200 I, S200 IIa, S200 IIb, S200 IIc, S200 IId, S200 III, S200 200, S200 IVa, S200 IVb e S200 V. A fração S200 IId apresentou atividade hemorrágica (Figura 4A) e foi submetida a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex™ 75 10/300 GL (Figura 4B), sendo obtidas as frações Sedex I e Sedex II. A fração Sedex I quando avaliada por SDS-PAGE apresentou várias bandas proteicas (Figura 4B), e foi submetida a cromatografia de troca iônica em coluna Asahipak ES-502N 7C, resultando em cinco frações: ES I, ES Ia, ES II, ES III e ES IV (Figura 4C). A fração ES Ia apresentou atividade hemorrágica (Figura 4C) e quando analisada mediante SDS – PAGE, apresentou uma única banda proteica com cerca de 25 kDa (Figura 4D). O grau de pureza foi confirmado por cromatografia em fase reversa em coluna C18 (Figura 4D).

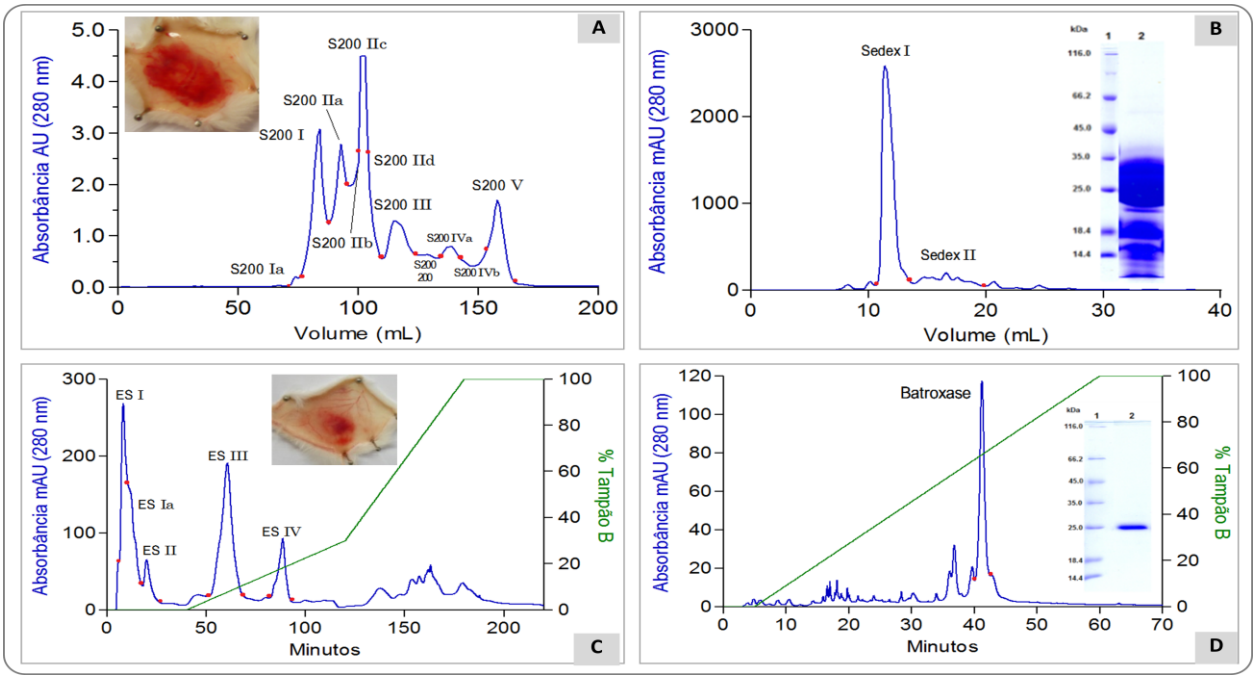

Figura 4. Purificação da Batroxase a partir da peçonha de Bothrops atrox. A) Cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200. Amostra: 300mg da peçonha bruta de *Bothrops atrox*, suspensos em 5,0mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05M pH 8,0. Tampão utilizado também para equilibrar a coluna e realizar a eluição em fluxo de 21mL/h. A absorbância foi registrada em comprimento de onda de 280nm. Observa-se também o resultado da atividade hemorrágica da fração S200 IId. **B) Filtração molecular em Superdex™ 75.** A fração S200 IId foi dissolvida em 500µL de tampão AMBIC 0,05M pH 8,0 e aplicada à coluna Superdex 75, equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo foi de 0,40mL/min e a absorbância das frações monitorada a 280nm. A SDS - PAGE apresentada corresponde à fração Sedex I. **C) Cromatografia de troca iônica.** A fração Sedex I (6,0µg) foi dissolvida em 500µL de tampão AMBIC 0,05M pH 7,4 e aplicada à coluna Asahipak ES-502N 7C previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi feita com AMBIC 0,05M pH 7,4 (Tampão A) e AMBIC 0,5M pH 7,4 (Tampão B). Fluxo de 0,5mL/min. A absorbância foi registrada em comprimento de onda de 280nm. O resultado da atividade hemorrágica com a fração ES Ia é mostrado. **D) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 da fração ES Ia.** Eluição feita com TFA 0,1% (tampão A) e Acetonitrila 70% + TFA 0,1% (tampão B), em fluxo de 1,0mL/minuto. No inserto a SDS - PAGE corresponde à Batroxase (27kDa) em presença de β-Mercaptoetanol.

4.2 Avaliação do potencial do soro da serpente *Bothrops alternatus* para inibir a atividade hemorrágica de metaloproteases

A inibição produzida pelo soro liofilizado da serpente *Bothrops* alternatus sobre a atividade hemorrágica de duas metaloproteases foi avaliada segundo o protocolo descrito no item 3.2.7.1. As metaloproteases utilizadas foram a Batroxase, uma SVMP da classe P-I isolada da peçonha da serpente *Bothrops atrox*, e a BjussuMP-I, uma SVMP da classe III isolada da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*. Foram utilizados 300μg de soro em cada avaliação, frente a 40μg de cada uma das metaloproteases (Figura 5)

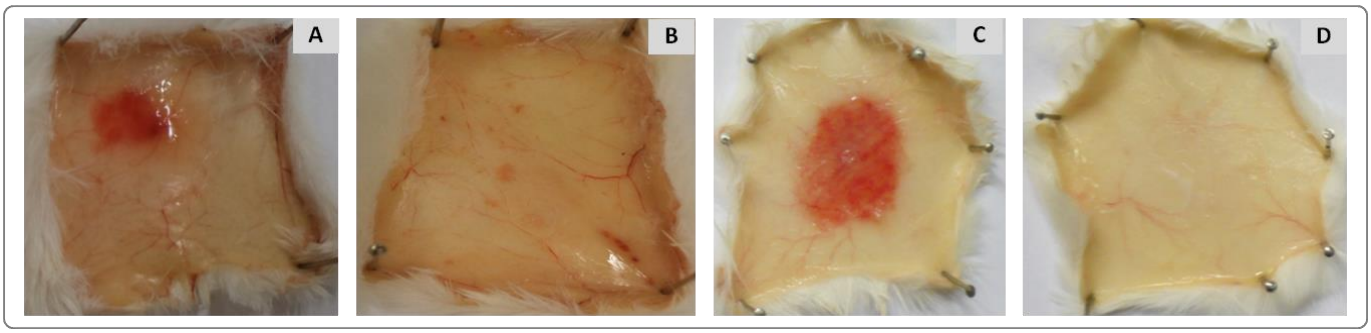

Figura 5. Inibição da atividade hemorrágica de metaloproteases da classe P-I e P-III pelo soro liofilizado da serpente *Bothrops alternatus*. A): Controle positivo Batroxase (40μg); **B):** Soro *B. alternatus* (300μg) com Batroxase (40μg); **C):** Controle positivo BjussuMP-I (20μg); **D)** Soro *B. alternatus* (300μg) com BjussuMP-I (20μg).

4.3 Purificação do inibidor de metaloproteases presente no soro da serpente *Bothrops alternatus*

Após evidenciar o potencial do soro da serpente *Bothrops alternatus* para inibir a ação hemorrágica de metaloproteases, foi dado inicio ao processo de purificação do inibidor sérico de metaloproteases, BaltMPI. Na figura 6 está detalhado o fluxograma desse processo.

No processo de purificação do inibidor a primeira etapa consistiu no fracionamento de 50mg do soro liofilizado da serpente *Bothrops alternatus* mediante uma cromatografia de troca iônica fraca em DEAE – Sepharose™, na qual foram obtidas seis frações, P1 a P6. Com amostras destas frações foi avaliada a inibição da atividade hemorrágica da Batroxase. As frações P5 e P6 inibiram a ação hemorrágica desta metaloprotease e apresentaram várias bandas proteicas em SDS – PAGE (Figura 7A). A fração P6 foi submetida à seguinte etapa, uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex™ 200, resultando em quatro frações cromatográficas: S200.1, S200.2, S200.3 e S200.4. A fração S200.4 inibiu a atividade hemorrágica da Batroxase e quando avaliada em SDS – PAGE evidenciou-se a presença de proteínas com diferentes massas moleculares (Figura 7B). Para separá-las, esta fração foi submetida a cromatografia de troca iônica forte em MonoQ™ 5/50 GL, resultando em quatro novas frações: QS200.1, QS200.2, QS200.3 e QS200.4. A fração QS200.1 inibiu a atividade hemorrágica da Batroxase e apresentou duas bandas de diferente massa molecular quando avaliada por SDS - PAGE (Figura 7C). Em seguida esta fração, QS200.1, foi submetida a cromatografia em fase reversa em coluna CLC-ODS C18, obtendo as frações: RPC.1, RPC.2 e RPC.3. A fração RPC.2 inibiu a atividade hemorrágica da Batroxase e apresentou uma banda única quando analisada por SDS – PAGE (Figura 7D). Porém foi submetida a uma recromatografia em fase reversa na mesma coluna com a finalidade remover o remanescente da fração RPC.3 (Figura 8A), em seguida foi confirmado o alto grau de pureza da fração resultante (Figura 8B) e a proteína obtida foi denominada BaltMPI (*Bothrops alternatus Metalloprotease Inhibitor*).

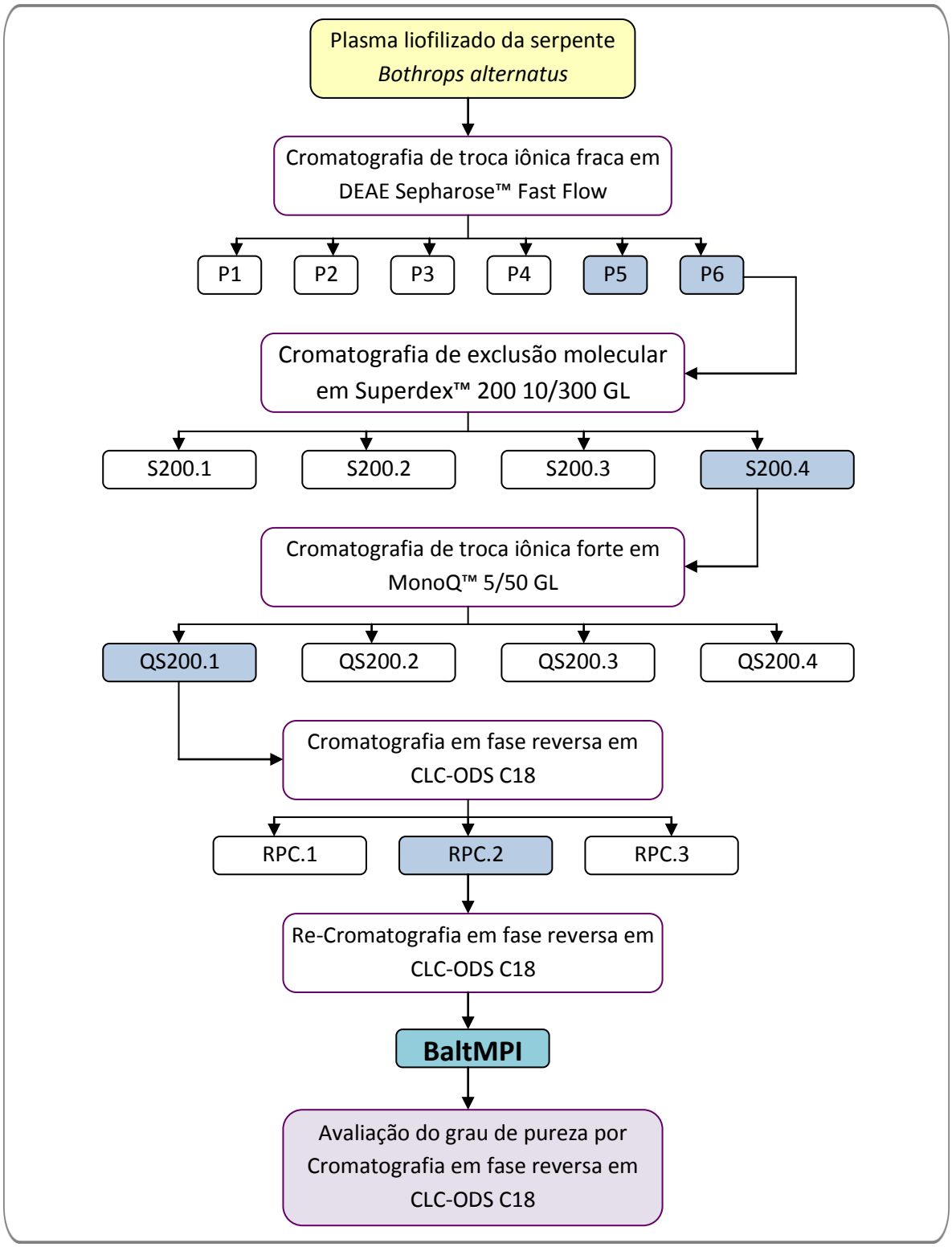

Figura 6. Fluxograma do procedimento de purificação do inibidor sérico presente na serpente *Bothrops alternatus*. As frações obtidas nas cromatografias foram avaliadas quanto à inibição da atividade hemorrágica da Batroxase. As frações destacadas em azul inibiram a atividade da Batroxase.

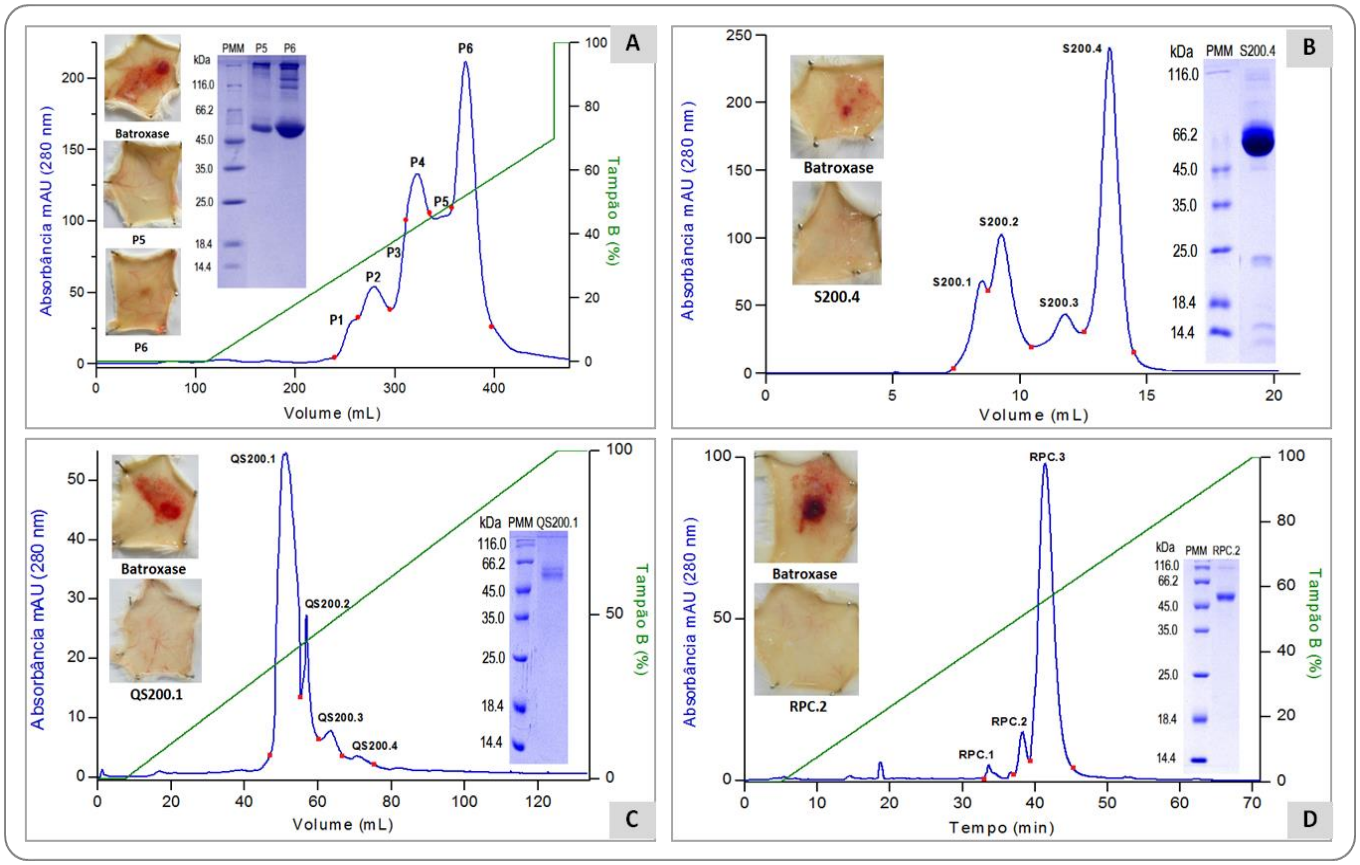

Figura 7. Purificação do inibidor de Batroxase a partir do soro da serpente *Bothrops alternatus*. A) Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose™. Amostra: 50mg de soro liofilizado da serpente *Bothrops alternatus*, dissolvidos em 2,0mL de tampão A: bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05M pH 8,0. A eluição foi feita com fluxo de 0,5mL/min, utilizando AMBIC 1,0M pH 8,0 (tampão B). A absorbância das frações foi monitorada a 280nm, e coletadas frações de 2mL/tubo. Observa-se também a inibição produzida pelas frações P5 e P6 sobre a atividade hemorrágica da Batroxase, assim como a SDS - PAGE dessas frações. **B) Fracionamento da fração P6 em Superdex™ 200**. Fase móvel - AMBIC 0,05M pH 8,0. A eluição foi feita em fluxo de 0,25mL/min, sendo coletadas frações de 500µL/tubo. A absorbância foi registrada a 280nm. A inibição sobre a atividade hemorrágica da Batroxase observada foi produzida pela fração S.200.4 e a SDS - PAGE também corresponde a esta fração. **C) Cromatografia de troca iônica em MonoQ™ 5/50 GL.** Amostra: 10µg da fração S200.4. Fase móvel - AMBIC 0,05M e 1,0M como tampão A e B respectivamente, ambos com pH de 8,0. A fração QS200.1 é a responsável pela inibição observada sobre a atividade hemorrágica da Batroxase, e a esta fração pertence a SDS - PAGE apresentada. **D) Cromatografia de fase reversa em coluna CLC-ODS C18.** Amostra: fração QS200.1, A eluição foi feita com TFA 0,1% (tampão A) e Acetonitrila 70% + TFA 0,1% (tampão B). Fluxo de 1,0 mL/min e monitoramento da absorbância das frações a 280nm. Observa-se também a inibição da atividade hemorrágica da Batroxase pela fração RPC.2 e o perfil eletroforético desta fração.

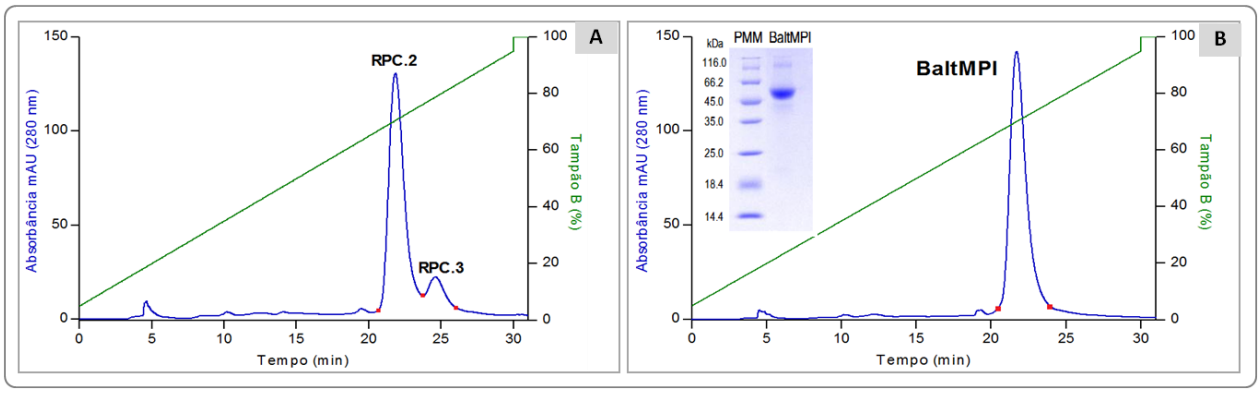

Figura 8. Cromatografia em fase reversa A) Recromatografia em fase reversa da fração RPC.2. Foi utilizado um gradiente linear do tampão B: ACN 70% + TFA 0,1%, de 5 a 95%, e como TFA 0,1% como tampão A do sistema. A eluição foi feita em 30 minutos com fluxo de 1mL/min e duas frações foram coletadas: RPC.2 e RPC.3. **B) Análise do grau de pureza do inibidor isolado.** As condições cromatográficas foram as mesmas descritas no item A. O pico obtido corresponde ao inibidor sérico de metaloproteases, BaltMPI, com alto grau de pureza.

Este processo de purificação do inibidor sérico BaltMPI demonstrou ter um baixo rendimento, sendo que o inibidor representou ao redor de 0,3% da massa total do soro utilizado (Tabela 1) e portanto, o processo de purificação anteriormente descrito precisou ser realizado repetidas vezes para acumular a quantidade de amostra necessária para realizar os testes bioquímicos e funcionais.

Tabela 1. Recuperação proteica do processo de purificação do BaltMPI

Etapa da Purificação	Proteína total (mg)	Rendimento (%)
Soro liofilizado	34,93[a]	100
DEAE-Sepharose™	9,02[a]	26
Superdex™ 200	4,31[a]	12
MonoQ™ 5/50 GL	1,87[a]	5
RP-HPLC	0,1[b]	0,3

[a]. Concentração de proteínas determinada pelo método de Scopes (1974).
[b]. Concentração de proteínas determinada pelo NanoDrop (Thermo Scientific).

4.4 Determinação da massa molecular

4.4.1 SDS - PAGE

A massa molecular relativa do BaltMPI foi estimada por SDS – PAGE, ao realizar a interpolação em uma curva logarítmica linear das massas moleculares das proteínas padrão versus a distância relativa de migração de cada proteína no gel, dessa forma, o valor de massa molecular relativa obtido para BaltMPI foi 60,5kDa (Figura 9).

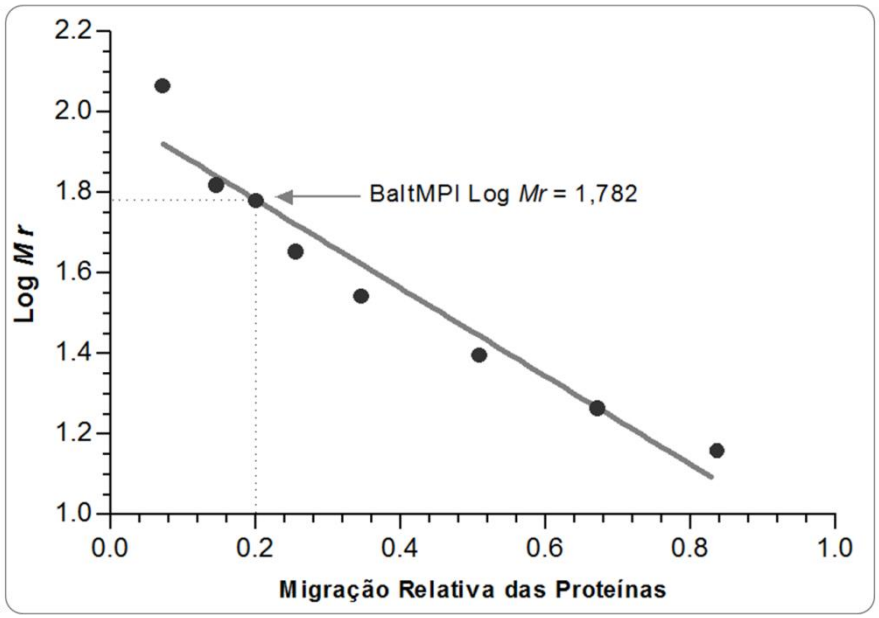

Figura 9. Determinação da massa molecular do inibidor BaltMPI. Curva logarítmica das massas moleculares das proteínas padrão versus a distância relativa de migração de cada uma na SDS – PAGE. Desataca-se com a seta o ponto na curva referente ao inibidor BaltMPI, que corresponde a uma massa molecular de 60,5kDa.

4.4.2 Espectrometria de massas MALDI/TOF/TOF MS

A massa molecular determinada para o BaltMPI por espectrometria de massas MALDI/TOF/TOF MS, no modo linear positivo, foi 42.360,04 Da+1, o qual corresponde ao maior pico observado no espectro (Figura 10). Além desse pico, também é observado no espectro um pico com massa molecular de 20.882,37 Da+1, que pode ser atribuído à proteína duplamente carregada.

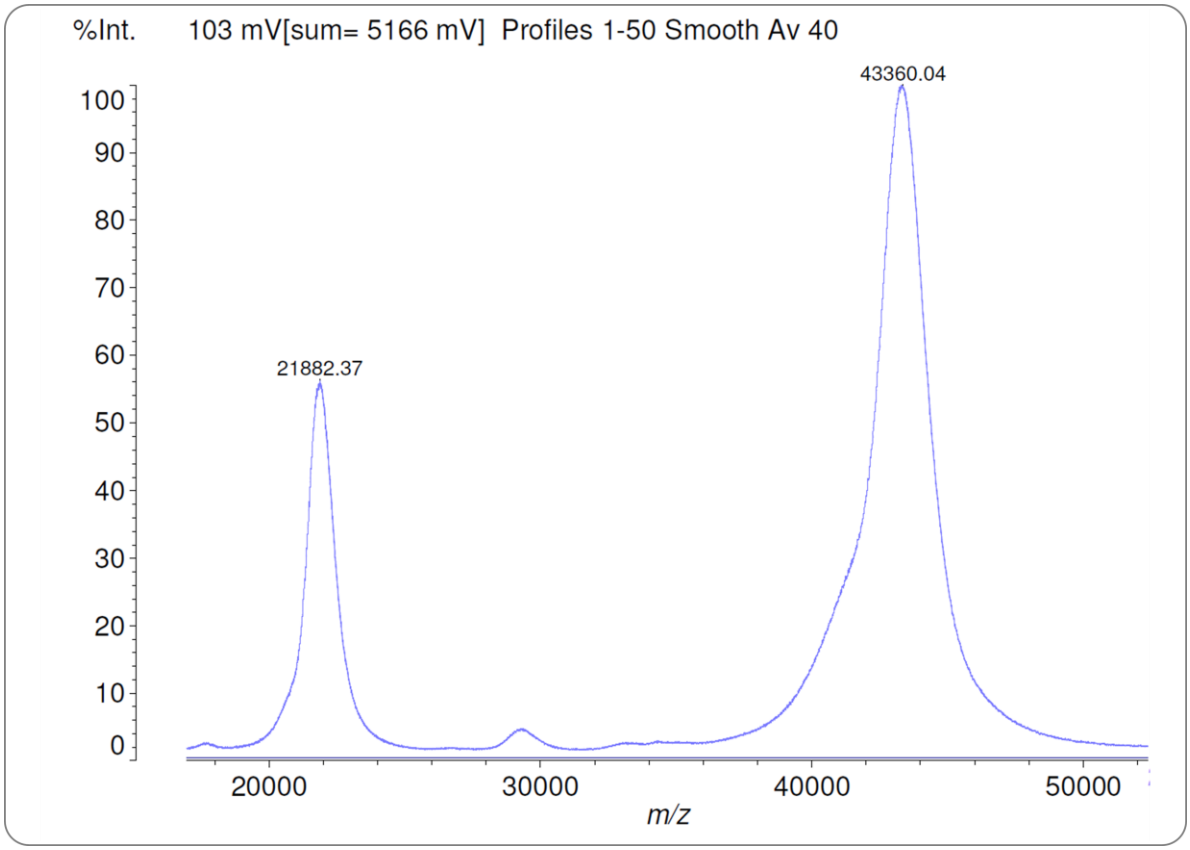

Figura 10. Determinação da massa molecular do BaltMPI por espectrometria de massas. Espectro linear do BaltMPI adquirido em espectrômetro MALDI/TOF/TOF MS no modo linear positivo.

4.5 Determinação do ponto isoelétrico (pI)

A focalização isoelétrica do BaltMPI permitiu estabelecer que se trata de uma proteína de caráter ácido com um pI de 5,27, que foi determinado graficamente como indicado no item 3.2.6 e confirmado pelo uso dos padrões proteicos com pI conhecido (Figura 11).

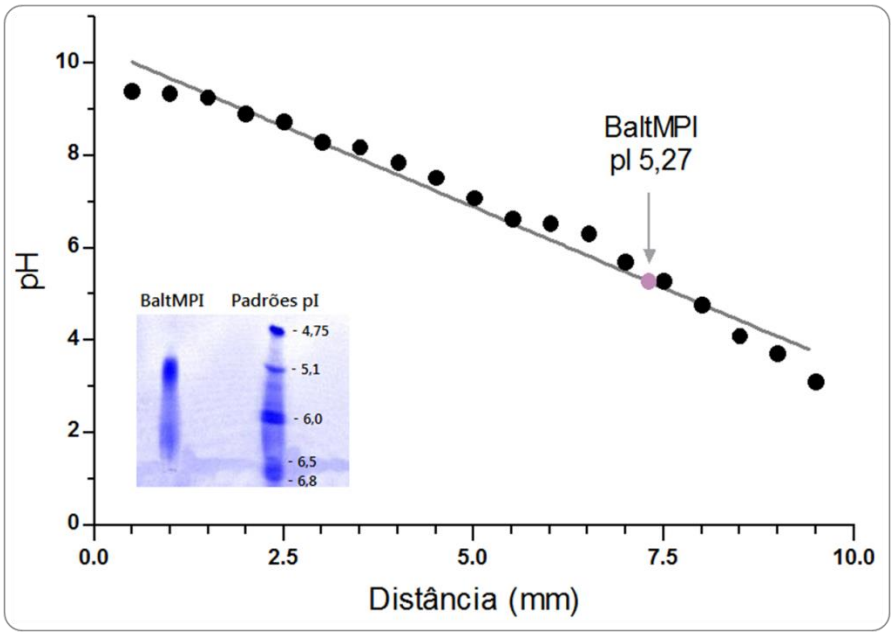

Figura 11. Determinação do ponto isoelétrico do BaltMPI. Curva do pH registrado versus distância no gel. Desataca-se com a seta o ponto isoelétrico determinado para o inibidor BaltMPI pela interpolação da distância que este migrou no gel. O inserto apresentado corresponde à seção ácida do gel de poliacrilamida no qual se levou a cabo a focalização isoelétrica, mostrando o BaltMPI e os padrões de pI ácido conhecido.

4.6 Determinação da sequência do BaltMPI

Pela degradação de Edman foram determinados os primeiros 60 resíduos da região N-terminal do inibidor BaltMPI. A sequência obtida foi alinhada com a sequência de proteínas relacionadas usando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), e a base de dados UniProtKB/Swiss-Prot, encontrando alto grau de homologia com outros fatores anti-hemorrágicos (Figura 12).

```
            1                                                        60
BaltMPI     SQVRGDLECDEKDAKEWTDIGVRYINEHKLHGYKYALNVIKNIVDVPWDGDWVAVFLKLN  Homologia
BJ46a       SQVRGDLECDEKDAKEWTDTGVRYINEHKLHGYKYALNVIKNIVVVPWDGDWVAVFLKLN     97%
jMSF        SQVRGDLECDDREAKEWADQAVRYINEHKLHEYKQALNVIKNIVVVPWNGDLVAVFLKLN     82%
cMDF        SQVRGDLECNDREAKEWADQAVRYINEHKLHEYKQALNVIKNIVVVPWNGDLVAVFLKLN     80%
HSF         SQVRGDLECDDKEAKNWADDAVRYINEHKLHGHKQALNVIKNICVVPWNGDLVAVFLELN     78%
```

Figura 12. Comparação da sequência N-terminal do BaltMPI com outras sequências de proteínas relacionadas. Homologia da região N-terminal do inibidor BaltMPI frente a mesma região de outros fatores anti-hemorrágicos já caracterizados: BJ46a (*Bothrops jararaca*, ID: Q9DGI0), jMSF (*Gloydius blomhoffii*, ID: Q5KQS1), cMDF (*Gloydius brevicaudus*, ID: Q5KQS4) e HSF (*Protobothrops flavoviridis*, ID: P29695). Em cinza estão destacados os resíduos de aminoácidos homólogos em todas as sequências apresentadas, em turquesa estão os dois únicos resíduos de aminoácidos que se diferenciam em relação ao fator BJ46a, e com o qual o inibidor BaltMPI apresenta o maior grau de homologia. Sublinhado encontra-se o domínio RGD. O ID corresponde ao identificador de sequência para cada proteína no banco de dados NCBI.

Após submissão do BaltMPI a digestão com tripsina e análise pelo MALDI/TOF/TOF MS dos peptídeos obtidos, foram determinadas as sequências desses peptídeos, que quando analisados pelo MASCOT (*Matrix Science*), utilizando SwissProt como base de dados, apresentaram homologia com o fator anti-hemorrágico BJ46a. Esses peptídeos junto com a sequência da região N-terminal determinada para o BaltMPI pela degradação de Edman foram alinhados com a sequência desse fator BJ46a, utilizando a ferramenta COBALT (*Constraint-based Multiple Alignment Tool*), do NCBI, e a base de dados UniProtKB/Swiss-Prot (Figura 13).

```
BJ46a   1    MNSLVALVLLGQIIGSTLSSQVRGDLECDEKDAKEWTDTGVRYINEHKLH  50
BaltMPI 1    -------------------SQVRGDLECDEKDAKEWTDIGVRYINEHKLH  31

BJ46a   51   GYKYALNVIKNIVVVPWDGDWVAVFLKLNLLETECHVLDPTPVKNCTVRP  100
BaltMPI 32   GYKYALNVIKNIVDVPWDGDWVAVFLKLNLLETECHVLDPTP--------  73

BJ46a   101  QHNHAVEMDCDVKIMFNVDTFKEDVFAKCHSTPDSVENVRRNCPKCPILL  150
BaltMPI 74   -----------VKIMFNVDTFKEDVFA-----------------------  89

BJ46a   151  PSNNPQVVDSVEYVLNKHNEKLSDHVYEVLEISRGQHKYEPEAYYVEFAI  200
BaltMPI 90   --------------------KLSDHVYEVLEISR----------------  103

BJ46a   201  VEVNCTAQELHDDHHHCHPNTAGEDHIGFCRATVFRSHASLEKPKDEQFE  250
BaltMPI 104  ------------------------------------SHASLEKPKDEQFE  117

BJ46a   251  SDCVILHVKEGHAHSHLIQQHVEKDSISPEHNNTALNFVHPHNDTSTSHE  300
BaltMPI 118  SDCVILHVKE----------------------------------------  127

BJ46a   301  SHEHLAEVPVAFVKKELPKDISDRHTTPVKGCPGKVHHFEL  341
BaltMPI      ----------------------------------------
```

Figura 13. Análise comparativa da sequência parcial do inibidor BaltMPI com a sequência do fator anti-hemorrágico BJ46a. Os resíduos de aminoácidos destacados em vermelho no alinhamento representam sítios altamente conservados, sendo os destacados em azul menos conservados. Encontram-se ressaltados em amarelo os aminoácidos que são diferentes em cada proteína e que ocupam a mesma posição, e ressaltados em azul os resíduos de cisteína presentes em ambas proteínas.

4.7 Determinação da Dose Inibitória Hemorrágica Mínima (DIHM) do BaltMPI e da Concentração Efetiva 50%.

Foi feita uma curva de inibição da atividade hemorrágica da Batroxase, avaliando o inibidor, BaltMPI, nas concentrações: 0,1; 0,5; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5μg, frente à dose hemorrágica mínima da Batroxase (10μg), conforme descrito no item 3.2.7.1, mediante a qual foi possível determinar que, frente a DHM da Batroxase (10μg), a DIHM do BaltMPI é 5μg (Figura 14).

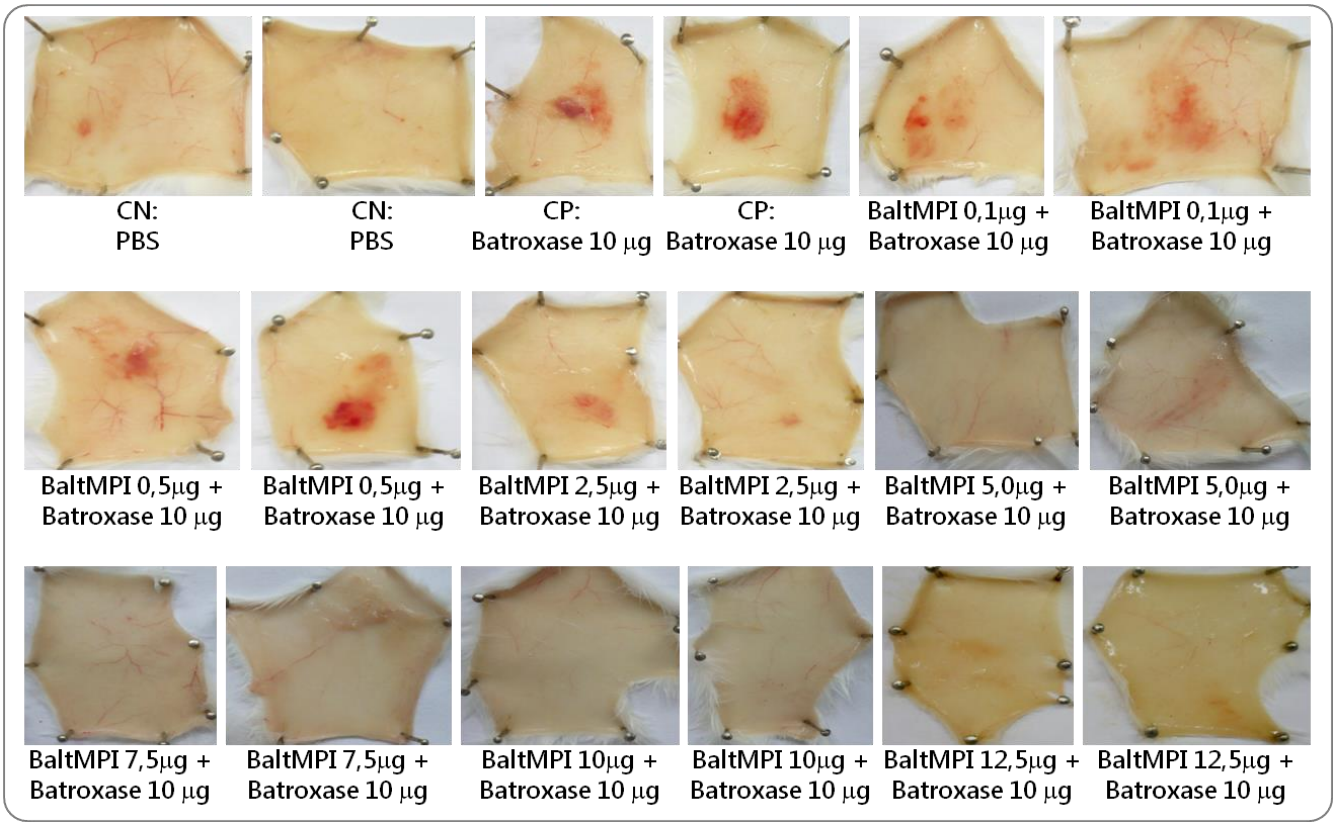

Figura 14. Dose Inibitória Hemorrágica Mínima (DIHM) do BaltMPI. A DIHM do BaltMPI foi determinada mediante a avaliação por duplicata da inibição produzida por este em diferentes concentrações sobre a atividade hemorrágica da Batroxase na sua DHM.

Os halos da hemorragia produzida por ambos os controles positivos, assim como os halos obtidos com cada uma das concentrações do BaltMPI quando desafiado frente à Batroxase, foram plotados no programa *GraphPad Prism 5* para a obtenção da curva concentração versus resposta mediante a qual se fez a determinação da Concentração Efetiva 50% do inibidor (Figura 15).

A concentração efetiva 50% determinada para o BaltMPI foi de 0,857μg, ou seja, nesta concentração o inibidor consegue reduzir à metade o halo hemorrágico produzido pela Batroxase na sua DHM (10μg).

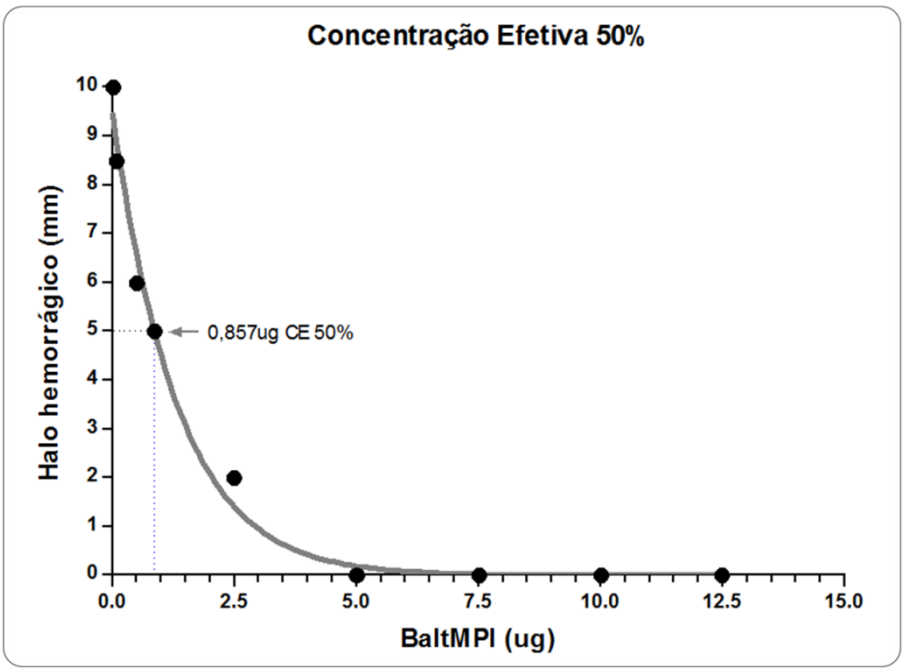

Figura 15. Determinação da Concentração Efetiva 50% do BaltMPI. Curva do halo hemorrágico (mm) versus a concentração do BaltMPI (μg) utilizada para inibir a atividade hemorrágica da Batroxase (10μg). O ponto indicado com a seta corresponde à CE50% do BaltMPI (0,857μg) determinada por interpolação.

4.8 Avaliação da inibição sem incubação prévia.

Ao avaliar a inibição da atividade hemorrágica do BaltMPI sobre a Batroxase, sem prévia incubação das duas proteínas, a 37°C por 30 minutos, conforme descrito no item 3.2.7.1, foram observados os resultados da figura 16.

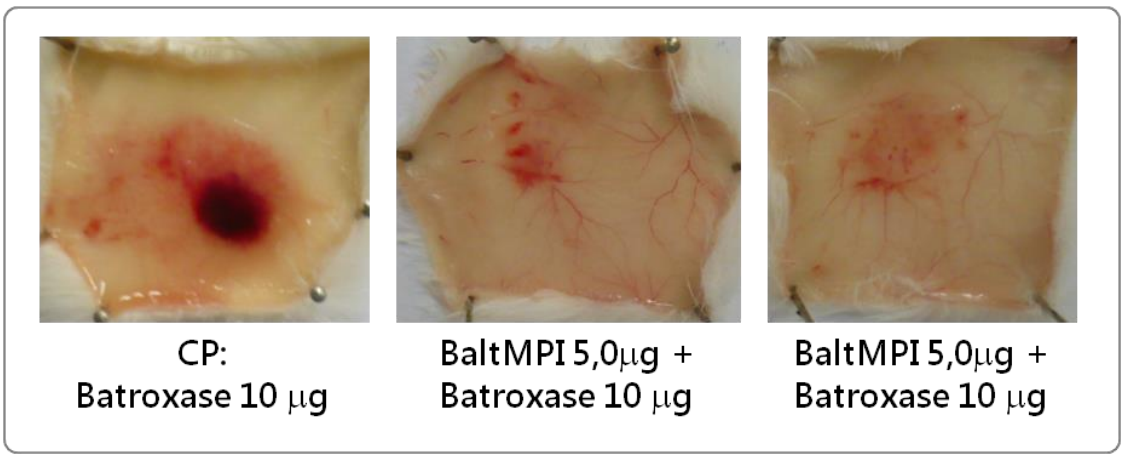

Figura 16. Avaliação da inibição da atividade hemorrágica sem incubação prévia entre o BaltMPI e a Batroxase. A atividade foi avaliada na DHM da Batroxase (10μg) e a DIHM do BaltMPI (5μg).

4.9 Avaliação do potencial do inibidor como complemento à soroterapia.

A avaliação do potencial do BaltMPI como complemento à soroterapia, foi mediante a inibição da atividade hemorrágica da Batroxase, com a variante que, as proteínas não foram nem misturadas, nem aplicadas conjuntamente. A Batroxase aplicada no dorso do camundongo, e o inibidor aplicado após a injeção da Batroxase em dois tempos diferentes: 0 e 10 minutos.

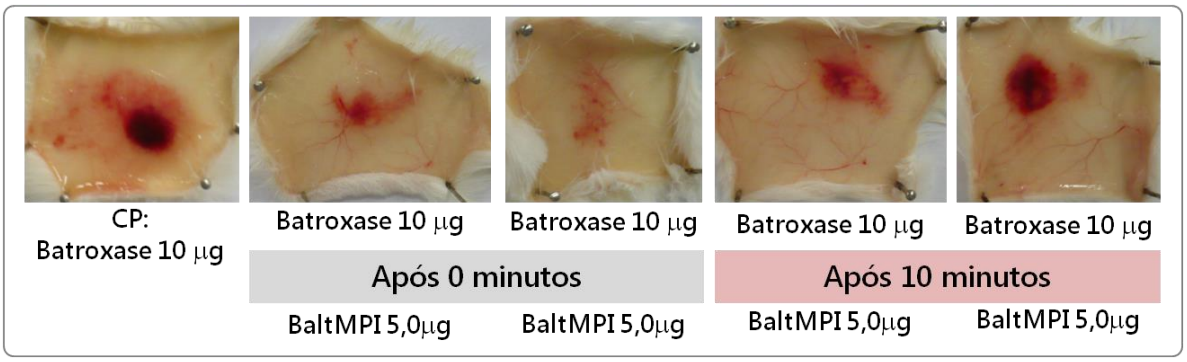

Figura 17. Avaliação do potencial do inibidor BaltMPI como complemento à soroterapia. A atividade foi avaliada na DHM da Batroxase (10μg) e a DIHM do BaltMPI (5μg).

4.10 Avaliação do potencial do inibidor sobre SVMPs P-III.

Foi avaliada a inibição da atividade hemorrágica da BjussuMP-I, uma metaloprotease da classe P-III, seguindo o protocolo descrito no item 3.2.7.1. A SVMP foi avaliada na sua DHM (4μg), frente a 10μg do inibidor.

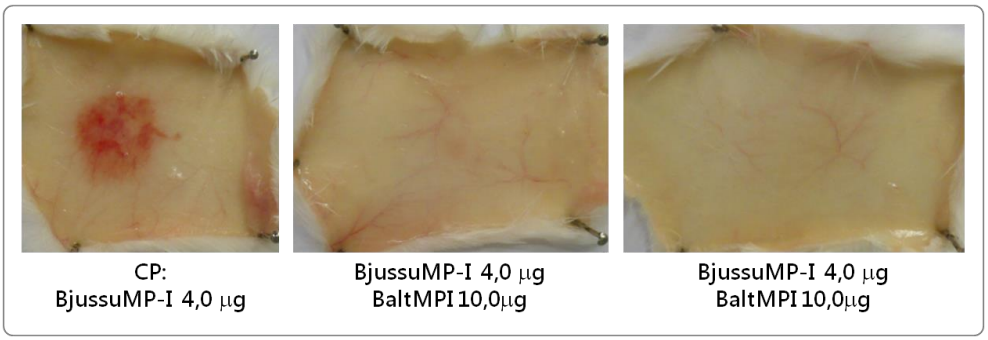

Figura 18. Avaliação do potencial do BaltMPI para inibir a hemorragia produzida pela BjussuMP-I, metaloprotease da classe P-III. A atividade foi avaliada na DHM da BjussuMP-I (4μg), frente a 10 μg do BaltMPI. As amostras foram incubadas, por 30 minutos a 37°C, e depois injetadas no dorso dos camundongos, seguindo a metodologia descrita no item 3.2.7.1.

4.11 Inibição da atividade Fibrinogenolítica

A inibição do BaltMPI sobre a atividade proteolítica da Batroxase sobre o fibrinogênio foi avaliada como descrito no item 3.2.8. Inicialmente esta avaliação foi realizada utilizando o BaltMPI e a Batroxase nas DIHM e DHM, respectivamente (Figura 19.A). Devido a que não foi observada a inibição sobre a atividade proteolítica da Batroxase, realizou-se posteriormente, a atividade utilizando o BaltMPI e a Batroxase em proporção molar 1:1 (Figura 19.B).

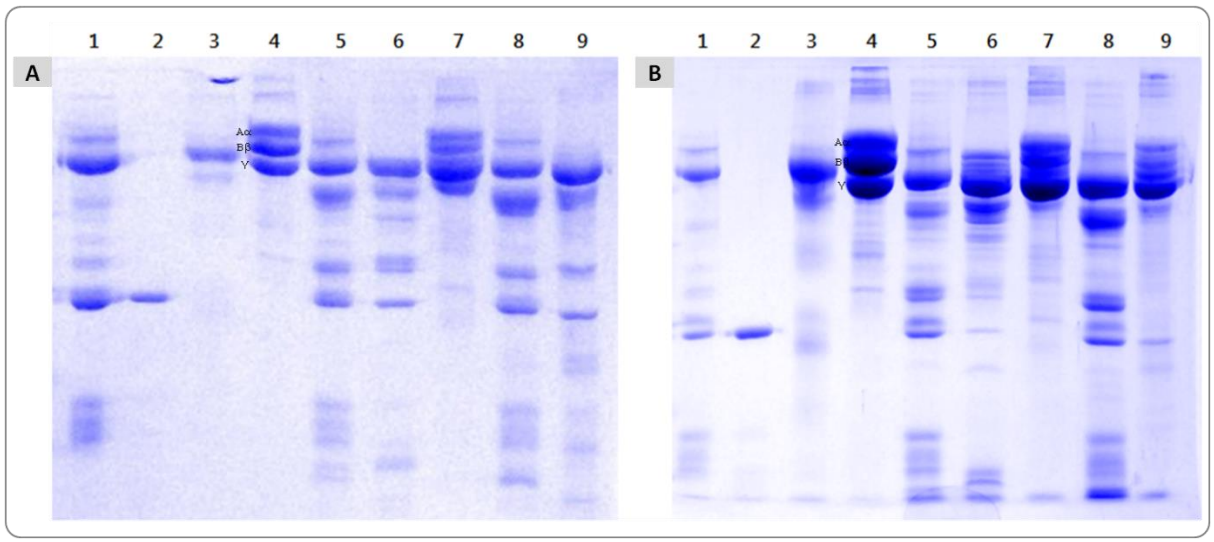

Figura 19. Avaliação da inibição da atividade fibrinogenolítica da Batroxase pelo inibidor BaltMPI. As amostras (8 e 9 A/B) foram incubadas com o BaltMPI a 37°C por 30 minutos, em seguida foi adicionado o fibrinogênio bovino a todas as amostras (1 a 9 A/B), e estas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após incubação foram avaliadas por SDS-PAGE a 12%. **A)** **1)** Peçonha *Bothrops atrox* (1μg); **2)** Batroxase (10μg); **3)** BaltMPI (5μg); **4)** Fibrinogênio (50μg); **5)** Fibrinogênio + Peçonha *Bothrops atrox* (1μg); **6)** Fibrinogênio + Batroxase (10μg); **7)** Fibrinogênio + BaltMPI (5μg); **8)** Fibrinogênio + (Peçonha *Bothrops atrox* (1μg) + BaltMPI (5μg)); **9)** Fibrinogênio + (Batroxase (10μg) + BaltMPI (5μg)). **B)** **1)** Peçonha *Bothrops atrox* (1μg); **2)** Batroxase (1μg); **3)** BaltMPI (2μg); **4)** Fibrinogênio (50μg); **5)** Fibrinogênio + Peçonha *Bothrops atrox* (1μg); **6)** Fibrinogênio + Batroxase (1μg); **7)** Fibrinogênio + BaltMPI (2μg); **8)** Fibrinogênio + (Peçonha *Bothrops atrox* (1μg) + BaltMPI (2μg)); **9)** Fibrinogênio + (Batroxase (1μg) + BaltMPI (2μg)).

4.12 Inibição da atividade Fibrinolítica

A inibição do BaltMPI sobre a atividade proteolítica da Batroxase sobre a fibrina foi avaliada como descrito no item 3.2.9. Esta avaliação foi realizada utilizando o BaltMPI e a Batroxase na DIHM e DHM, respectivamente (Figura 20).

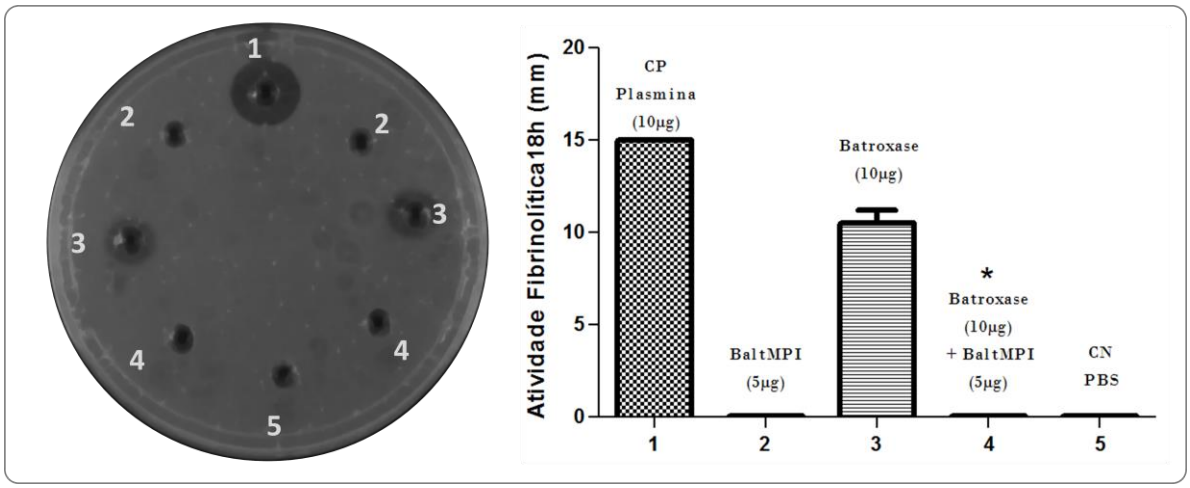

Figura 20. Avaliação da inibição da atividade fibrinolítica. A atividade fibrinolítica foi avaliada pela medição em milímetros dos halos de lise resultantes após incubação das placas de fibrina com as amostras por 18 horas. Resultados expressos como a média ± SD (n=2). O valor da inibição do BaltMPI sobre a Batroxase foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

4.13 Inibição da atividade proteolítica sobre azocaseína

Foi avaliada a inibição do BaltMPI sobre a atividade proteolítica da Batroxase sobre a azocaseína seguindo o método descrito no item 3.2.11. Os dados obtidos foram expressos como porcentagem da atividade residual da Batroxase, considerando como 100% a atividade desta (CP) (Figura 21).

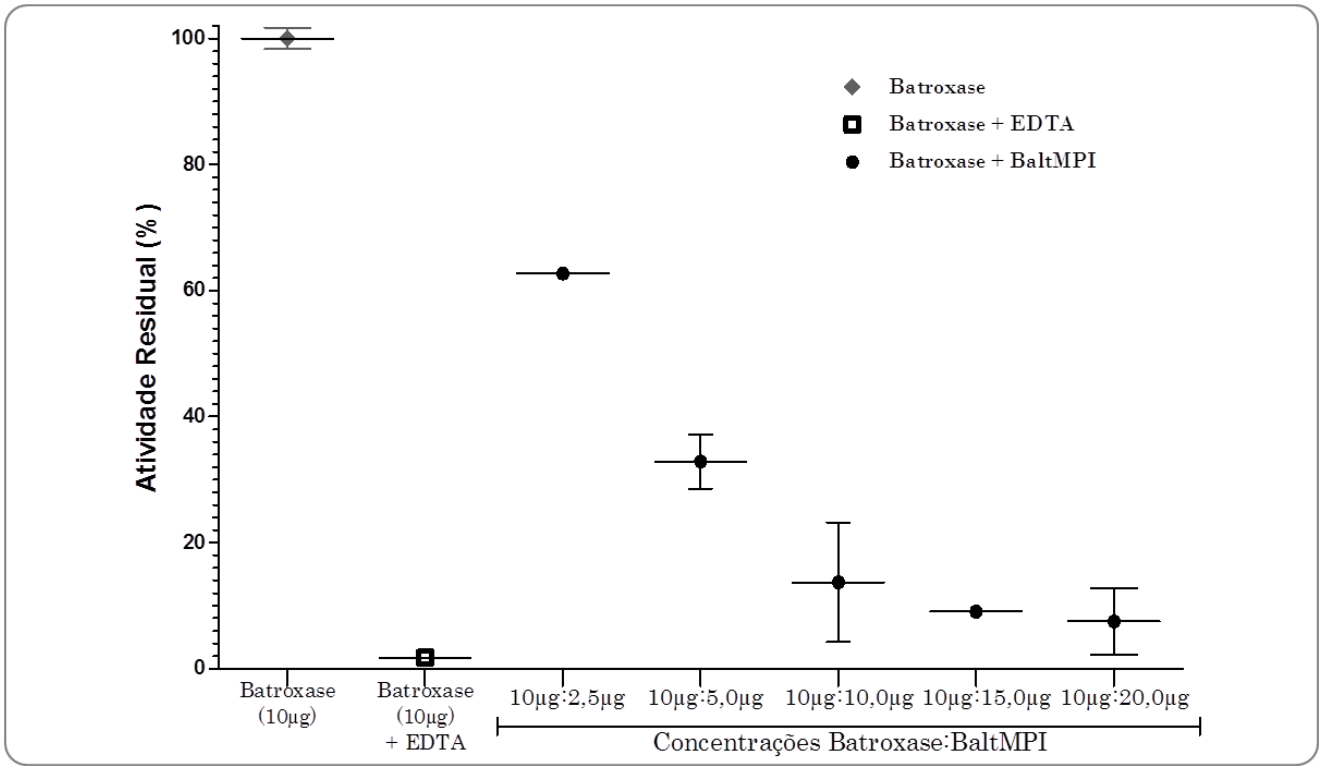

Figura 21. Atividade residual da Batroxase sobre a azocaseína na presença de inibidores. A Batroxase (10ug) foi incubada com o inibidor BaltMPI em diferentes concentrações (2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0µg) e foi avaliada a sua atividade proteolítica sobre a azocaseína. A atividade residual foi expressa como a porcentagem da atividade obtida com a metaloprotease na ausência do inibidor. O EDTA foi utilizado como controle da inibição sobre a Batroxase. Resultados expressos como a média ± SD (n=2).

4.14 Avaliação da especificidade do BaltMPI.

A especificidade da ação inibitória do BaltMPI, foi avaliada mediante o estudo do seu efeito inibitório sobre a ação proteolítica que, a Batroxase (metaloprotease) e a BjSP (serinoprotease), possuem sobre o fibrinogênio, seguindo o método descrito para a atividade fibrinogenolítica no item 3.2.9, e utilizando o inibidor e as proteases na proporção molar 1:1, respectivamente (Figura 22).

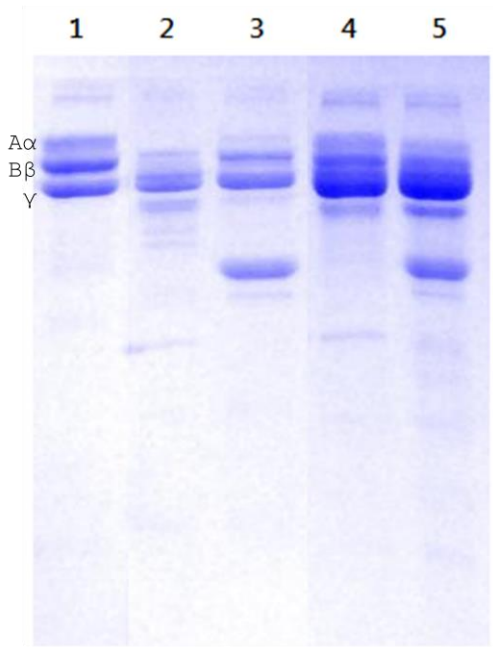

Figura 22. Avaliação da especificidade da ação inibitória do BaltMPI sobre proteases. O inibidor BaltMPI foi incubado a 37°C por 30 minutos com cada uma das proteases, em seguida foi adicionado o fibrinogênio bovino a todas as amostras, e estas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após incubação, as amostras foram avaliadas por SDS-PAGE a 12%. 1) Fibrinogênio bovino; 2) Fibrinogênio + Batroxase (1μg); 3) Fibrinogênio + BjSP (2μg); 4) Fibrinogênio + (Batroxase (1μg) + BaltMPI (2μg)); 5) Fibrinogênio + (BjSP (2μg) + BaltMPI (2μg)).

4.15 Estudo da complexação BaltMPI – Batroxase.

A avaliação da complexação entre o inibidor, BaltMPI, e a metaloprotease, Batroxase, foi realizada mediante SDS - PAGE 12%, à qual as amostras foram submetidas após incubação em proporção molar 1:1 por 30 minutos a 37°C (Figura 23).

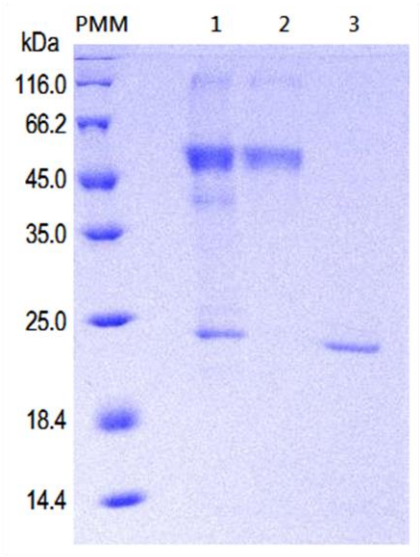

Figura 23. Estudo da complexação BaltMPI – Batroxase mediante SDS - PAGE. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos e em seguida, submetidas a SDS – PAGE 12%. 1) BaltMPI (2μg) + Batroxase (1μg); 2) BaltMPI (2μg); 3) Batroxase (1μg).

4.16 Estabilidade do inibidor BaltMPI

O inibidor, BaltMPI, foi submetido a diversas condições, de temperatura e pH, para avaliar a sua estabilidade. Diferentes amostras de BaltMPI foram mantidas por 30 minutos a -80; -20, 4, 60 e 100°C, e pelo mesmo lapso de tempo, amostras adicionais do inibidor foram mantidas em solução com: TFA 0,1% (pH 1,0), Acetato de sódio 0,5M (pH 5,0), Fosfato de sódio 0,1M (pH 8,0) e Tris – HCl 0,5M (pH 9,0). Posteriormente, cada uma destas amostras foi avaliada quanto à inibição da atividade hemorrágica (item 3.2.7.1), utilizando o inibidor e a Batroxase nas suas DIHM e DHM, respectivamente (Figura 24). As amostras solubilizadas em pH ácidos, foram neutralizadas antes da incubação com a Batroxase. As condições estabelecidas como controle da atividade foram aquelas utilizadas rotineiramente, ou seja, temperatura de 37°C e pH de 7,4.

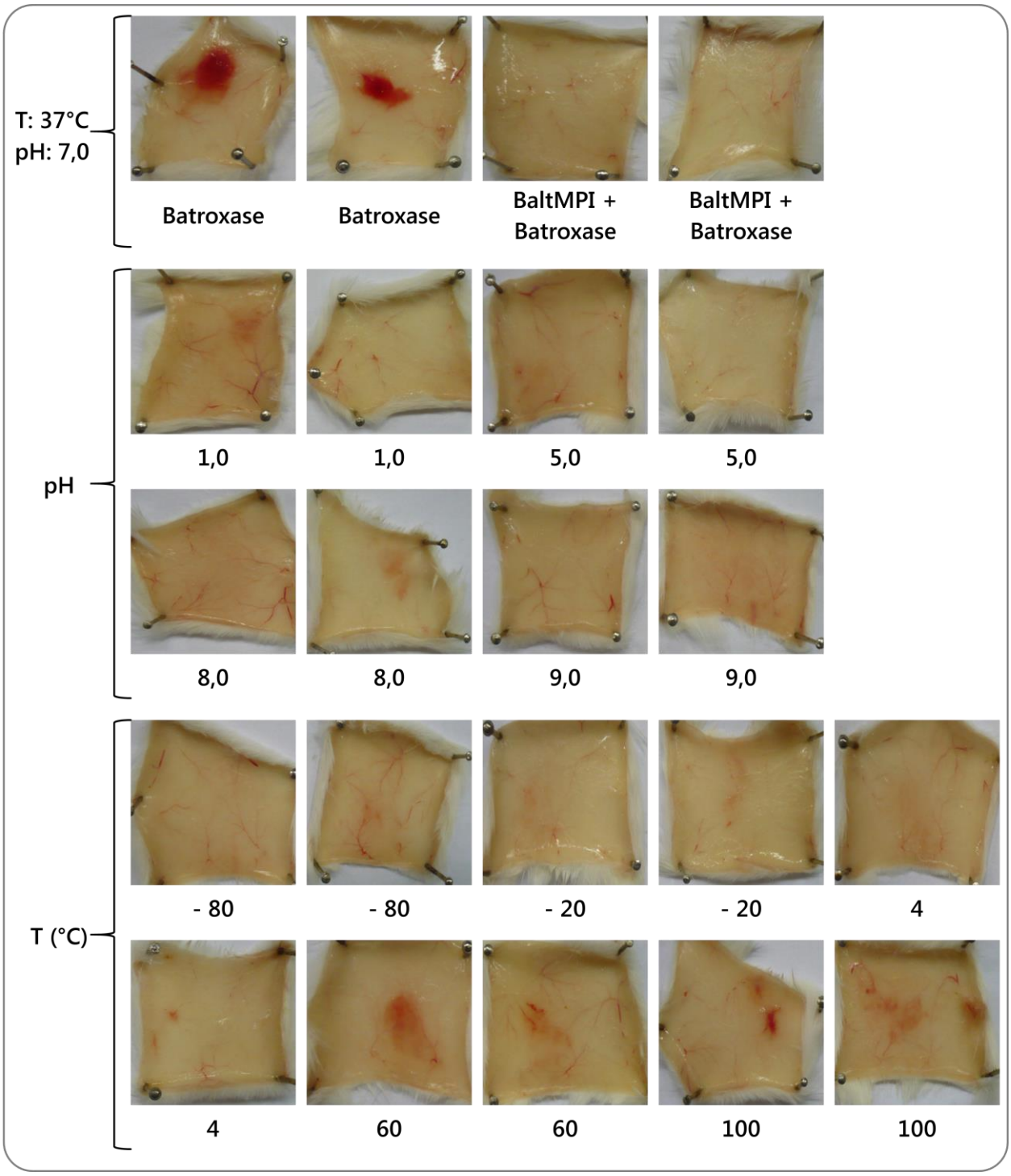

Figura 24. Avaliação da estabilidade do inibidor BaltMPI em diferentes pH e temperaturas. Após manter as amostras (5μg) do inibidor BaltMPI em diferentes condições, de temperatura e pH, por 30 minutos, foi avaliada a inibição da atividade hemorrágica da Batroxase (10μg) com cada uma destas amostras, determinando as condições nas quais o inibidor perde a sua atividade.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Na literatura encontram-se vários SVMPIs descritos e/ou caracterizados em diferentes extensões. Estes inibidores tem sido isolados a partir do plasma ou soro de várias serpentes, tanto peçonhentas quanto não peçonhentas, assim como do plasma, soro ou músculo de mamíferos, como gambás, ouriços, mangustos, e esquilos. É importante ressaltar que no caso do *Didelphis marsupialis*, tem sido evidenciada a presença destes SVMPIs no plasma de animais recém nascidos, e no leite materno, o que indica fenômeno de imunidade natural (Jurgilas *et al.*, 1999). Assim mesmo, está amplamente documentada a imunidade que as serpentes peçonhentas possuem frente a sua própria peçonha e a peçonha de outras serpentes, o que as ampara de sofrer os danos decorrentes da ação tóxica destas (Omori-Satoh *et al.*, 1972; Domont *et al.*, 1991; Thwin e Gopalakrishnakone, 1998).

No presente trabalho foi isolado, a partir do soro da serpente *Bothrops alternatus*, um inibidor de metaloproteases, nomeado BaltMPI (*Bothrops alternatus metalloprotease inhibitor*), mediante um processo cromatográfico que constou de quatro etapas cromatográficas consecutivas: troca iônica em DEAE Sepharose™ (Figura 7A), exclusão molecular em Superdex™ 200(Figura 7B), troca iônica em MonoQ™ 5/50GL (Figura 7C), e fase reversa em coluna CLC-ODS C18 (Figuras 7D e 8A). As três primeiras cromatografias foram realizadas no sistema FPLC, enquanto a última foi realizada no sistema HPLC. Mediante este processo, que precisou ser realizado inúmeras vezes devido ao baixo rendimento (0,3%), o inibidor BaltMPI foi obtido com elevado grau de pureza, o qual foi avaliado por cromatografia em fase reversa em coluna C18 (Figura 8B) e SDS - PAGE (Figura 7D).

Em comparação com a ampla caracterização que se tem sobre as peçonhas de serpentes, o conhecimento adquirido sobre a bioquímica do sangue e/ou soro destas, assim como dos animais que exibem resistência à peçonha de serpentes, é muito

menor (Proverbio *et al.*, 2012; Parida *et al.*, 2014), mesmo assim, é extensamente utilizado e referenciado na literatura, para a purificação de uma ou várias proteínas de interesse a partir destas matrizes complexas, o mesmo processo de combinação de diversas técnicas cromatográficas, utilizadas consecutivamente, valendo-se de diferentes mecanismos para a separação (Omori-Satoh *et al.*, 1972; Straight *et al.*, 1976). Neste sentido, encontram-se publicados vários trabalhos exemplificando esse processo, os quais foram eficientes para o isolamento a partir do soro, de serpentes e/ou animais resistentes à peçonha destas, de fatores que lhes conferem proteção frente aos efeitos tóxicos decorrentes das peçonhas ofídicas ou seus componentes.

O complexo antibotrópico (ABC), foi isolado por Perales *et al.* (1994) a partir do soro do *Didelphis marsupialis*, mediante cromatografia em DEAE Sephacel™. Posteriormente, Neves-Ferreira *et al.* (2000) fracionaram este complexo com sulfato de amônio, e submeteram-no a cromatografias em coluna Phenyl Sepharose e Superdex™ 200, obtendo assim as proteínas DM40 e DM43, que formam o complexo ABC, o qual confere ao *Didelphis marsupialis*, resistência aos efeitos letais e hemorrágicos da peçonha de *Bothrops jararaca*. Do soro de outro marsupial, pertencente ao mesmo gênero, o *Didelphis virginiana*, foi isolado um fator anti-hemorrágico por Menchaca e Perez (1981), mediante três passos cromatográficos consecutivos, Sephadex G-200, DEAE A-50 e Sephadex G-100. Esse fator consegue neutralizar a atividade hemorrágica resultante da ação da serpente *Crotalus atrox*. Também do soro deste animal foi isolado, por Catanese e Kress (1992), mediante fracionamento do soro com sulfato de amônio, seguido de cromatografia em DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose e MonoQ HR 5/5, um fator anti-hemorrágico, nomeado Oprin, que inibiu tanto a ação de metaloproteases, quanto a ação da hemorrágica da peçonha de *Crotalus atrox*. Do soro do marsupial, *Philander opossum*, foi isolado por Jurgilas *et al.* (2003), o fator PO41, um inibidor de metaloproteases, através de

cromatografias em DEAE Sephacel, Phenyl Superose e Superdex™ 200. Biardi *et al.* (2011), isolaram a partir do soro de um esquilo, *Spermophilus beecheyi*, um inibidor de metaloproteases, mediante as cromatografias consecutivas em coluna HiTrap Blue HP e MonoQ™ HR 5/5, a este fator é atribuída em grande parte, a resistência observada nos esquilos frente a várias peçonhas crotálicas.

Do mesmo modo, foi isolado por Omori-Satoh *et al.* (1972), do soro da serpente *Trimeresurus flavoviridis*, o fator anti-hemorrágico HSF através de fracionamento do soro com sulfato de amônio e etanol, seguido de cromatografia em Sephadex G-200 e DEAE Cellulose. Este fator não só inibiu a atividade hemorrágica de HR1 e HR2, os principais fatores hemorrágicos presentes na peçonha autóloga, também inibiu a atividade letal da peçonha. Borkow *et al.* (1995) obtiveram o fator anti-hemorrágico, BaSAH, a partir do soro da serpente *Bothrops asper*, ao submeter o soro a fracionamento com sulfato de amônio, e cromatografias em Sephacryl S200, DEAE Sephararose, em pH 7,2 e 8,3, finalizando com uma cromatografia em Phenyl Sepharose CL4B. Já, os fatores anti-hemorrágicos, cMSF, da serpente *Gloydius blomhoffii brevicaudus*, e o jMSF, da serpente *Gloydius blomhoffii*, foram isolados por Aoki *et al.* (2008), ao fracionar o soro de cada serpente com etanol, e submeter a fração de interesse a uma cromatografia de fase reversa em coluna C8. Um último exemplo é o trabalho de Valente *et al.* (2001). Eles fracionaram com sulfato de amônio o soro da serpente *Bothrops jararaca*, seguidamente realizaram cromatografia em Phenyl Sepharose e fase reversa em coluna C4, obtendo assim o fator anti-hemorrágico BJ46a, o qual inibe a atividade proteolítica de metaloproteases e a atividade hemorrágica da peçonha autóloga.

Como evidenciado nestas metodologias, o uso da cromatografia em fase reversa, que foi usada no presente trabalho, não tem sido uma técnica frequentemente utilizada, porém a medida que se isolam e caracterizam mais inibidores de

metaloproteases a partir do soro ou plasma destes animais, conhece-se mais acerca das suas características gerais, entre as quais se encontra a estabilidade que estes inibidores tem demonstrado possuir frente às condições nas quais se leva a cabo este tipo de cromatografia e que são, usualmente, consideradas agressivas, devido ao caráter dos solventes utilizados (Menchaca e Perez, 1981; Perales *et al.*, 2005; Neves-Ferreira *et al.*, 2010).

Além desta estabilidade, existem outras características que são comuns aos inibidores de metaloproteases até agora descritos, dentre estas estão que, são glicoproteínas de caráter ácido, termoestáveis e funcionais em uma ampla faixa de pH, com pontos isoelétricos entre 3,5 e 5,4, que podem ter massa molecular na faixa de 40 a 95 kDa, ou na faixa de 700 a 1090 kDa, sendo mais abundantes os de baixa massa molecular (Perales *et al.*, 2005; Neves-Ferreira *et al.*, 2010). O inibidor BaltMPI, isolado a partir do soro da serpente *Bothrops alternatus*, tem-se mostrado não ser uma exceção. A massa molecular determinada para este inibidor foi de 60,5 kDa, mediante SDS – PAGE (Figura 9), e de 43,4 kDa, mediante espectrometria de massas (Figura 10), ou seja, encontra-se na faixa de inibidores de baixa massa molecular. Deve-se ressaltar que a diferença observada na determinação da massa pelos métodos mencionados, pode ser atribuída a que a determinação por SDS - PAGE tem uma margem de erro maior do que a determinação por espectrometria de massas, pois além de ser esta técnica espectrométrica mais precisa, na determinação eletroforética existem vários fatores que influenciam a migração da proteína no gel, um deles é o estado não reduzido do inibidor, pois a eletroforese foi realizada em condições não redutoras, e caso a proteína possua pontes dissulfeto intra cadeia, estas não são rompidas pela presença do SDS, o que se traduz em uma migração menor no gel (Sallantin *et al.*, 1990). Outro fator, é que a proteína pode ser glicosilada, e devido aos resíduos de açucares, a interação da proteína com as moléculas do SDS diminui, o

que faz com que não se obtenha a constante de ligação normalmente obtida entre as proteínas não glicosiladas e as moléculas do SDS, e que resulta em uma relação massa – carga menor e, portanto, em uma migração menor da proteína no gel (Segrest *et al.*, 1971; Poduslo, 1981). E mesmo, não estando presente na sequência parcial do BaltMPI o *motif* de glicosilação NXS/T (Figura 13), este último fator tem importância ao considerar que outros inibidores são proteínas glicosiladas, e que, adicionalmente na sua caracterização apresentaram diferenças entre as massas moleculares determinadas mediante a SDS - PAGE e a espectrometria de massas (Aoki *et al.*, 2008). Exemplo disto são os inibidores BJ46a, HSF e cMSF, proteínas glicosiladas com massas moleculares determinadas por SDS - PAGE e espectrometria de massas de, 55,4 kDa e 46,1 kDa no caso do primeiro (Valente *et al.*, 2001), de 68 kDa e 47,8 kDa, no caso do segundo (Deshimaru *et al.*, 2003), e, de 48 kDa e 40,5 kDa, no caso do último (Aoki *et al.*, 2008). Assim mesmo, o DM40, DM43, Oprin e PO41, SVMPIs provenientes do soro ou plasma de mamíferos resistentes à peçonha de serpentes, também são proteínas glicosiladas (Catanese e Kress, 1992; Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Jurgilas *et al.*, 2003; Neves-Ferreira *et al.*, 2010).

Em relação à determinação do ponto isoelétrico, o BaltMPI apresentou um pI de 5,27 (Figura 11), ou seja, é uma proteína de caráter ácido, característica reconhecida em todos os inibidores de metaloproteases até agora caracterizados. Assim mesmo, as condições de pH e temperatura nas quais o BaltMPI conserva a sua capacidade de inibir as metaloproteases, são similares às condições nas quais os outros inibidores conservam também a sua atividade. Sendo que, após ser submetido a condições de pH na faixa de 1,0 a 9,0, o BaltMPI, demonstrou manter a sua capacidade de inibir a ação hemorrágica da Batroxase, enquanto que, nas condições de temperatura de 60 e 100°C, ele apresentou diminuição da sua atividade (Figura 21). Na tabela 2 são

sumarizadas propriedades físico-químicas de inibidores já caracterizados junto com as propriedades físico-químicas determinadas para o BaltMPI.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos SVMPIs

Nome	Isolado do soro da espécie	Massa molecular (kDa)	pI	Glicosilação	pH[a]	Temperatura (°C)[b]
BaltMPI	*Bothrops alternatus*	42	5,3	nd	1,0 – 9,0	<60
DM43[1]	*Didelphis marsupialis*	43	<3,5	Sim	nd	nd
Oprin[2]	*Didelphis virginiana*	52	3,5	Sim	2,5 – 11,5	70
PO41[3]	*Philander opossum*	41	<3,5	Sim	nd	nd
BJ46a[4]	*Bothrops jararaca*	46	4,6	Sim	nd	nd
HSF[5]	*Trimeresurus flavoviridis*	48	4,0	Sim	1,0 – 13,0	100
BaSAH[6]	*Bothrops asper*	66	5,2	nd	1,5 – 9,0	60
cMSF[7]	*Gloydius blomhoffii brevicaudus*	41	nd	Sim	1,0 – 13,0	60
jMSF[8]	*Gloydius blomhoffii*	41	nd	Sim	nd	nd

[a] Inibição de SVMPs depois de ter sido submetido, no mínimo 30 minutos, a esta faixa de pH.
[b] Inibição de SVMPs depois de ter sido submetido, no mínimo 15 minutos, a esta temperatura.
[1] Neves-Ferreira *et al.*, 2000.
[2] Catanese e Kress, 1992.
[3] Jurgilas *et al.*, 2003.
[4] Valente *et al.*, 2001.
[5] Omori-Satoh *et al.*, 1972, Omori-Satoh, 1977, Yamakawa e Omorisatoh, 1992.
[6] Borkow *et al.*, 1995.
nd: não determinado.

O grau de homologia entre o BaltMPI e outros inibidores foi determinado após obtenção dos primeiros 60 resíduos da região N-terminal deste inibidor, mediante a degradação de Edman, sendo obtida a sequência: SQVRGDLECDEKDAKEWTDIGVRYIN EHKLHGYKYALNVIKNIVDVPWDGDWVAVFLKLN. O grau de homologia determinado entre o BaltMPI e os inibidores, BJ46a, cMSF, jMSF, e, HSF, todos eles provenientes

do soro de serpentes da família *Viperidae*, foi bastante alto (Figura 12), sendo que com o inibidor BJ46a, apresentou o maior grau de homologia, 97%, e dos 60 resíduos de aminoácidos comparados, o BaltMPI se diferencia do BJ46a, unicamente pelos aminoácidos Ile25 e Asp45, que no caso do BJ46a são, Thr25 e Val45. O grau de homologia na região N-terminal com os outros inibidores, mesmo sendo considerável, foi menor que o encontrado com o inibidor proveniente da *Bothrops jararaca*, o qual pode ser atribuído ao distanciamento filogenético entre as espécies da quais cada inibidor provém, pois da mesma forma, os inibidores cMSF e jMSF, apresentaram um grau de homologia maior com o inibidor HSF, que com o inibidor BJ46a (Aoki *et al.*, 2008). Mesmo assim, todos estes inibidores pertencem à super família das cistatinas, da qual o HSF foi o primeiro membro (Neves-Ferreira *et al.*, 2010).

Adicionalmente, todas as regiões N-terminal desses inibidores contem um domínio RGD, altamente conservado, que também é encontrado nas desintegrinas das peçonhas de serpentes. Esse domínio é essencial na ligação à fibronectina, uma proteína extracelular que promove a adesão celular, e as proteínas que o possuem, exercem um forte efeito inibitório sobre a agregação plaquetária induzida pelo ADP (Yamakawa e Omorisatoh, 1992; Aoki *et al.*, 2008). Este efeito inibitório sobre a agregação plaquetária foi avaliado com o inibidor HSF, encontrando que exerce uma inibição muito mais fraca, quando comparado com outras desintegrinas, embora ainda permaneça desconhecida a função e relevância que este domínio RGD, dos SVMPIs, possa possuir sobre a inibição de metaloproteases (Yamakawa e Omorisatoh, 1992).

Outros segmentos da sequência do BaltMPI, foram determinados ao submeter o inibidor a uma digestão com tripsina, onde os peptídeos gerados foram detectados por espectrometria de massas ESI-QUAD/TOF. Posteriormente, os dados obtidos foram analisados pelo MASCOT, para determinar o grau de homologia dos peptídeos com sequências de proteínas já caracterizadas na base de dados SwissProt. Mediante este

processo, novamente foi encontrada homologia do BaltMPI com o inibidor BJ46a. Assim, os dados obtidos para o BaltMPI, mediante a degradação de Edman e a análise por espectrometria de massas dos peptídeos trípticos, e que constituem a sequência parcial obtida para este SVMPI, foram alinhados com a sequência determinada por Valente *et al.* (2001) para o inibidor BJ46a (Figura 13). A porcentagem de cobertura, sobre a sequência do inibidor BJ46a, pela sequência parcial do BaltMPI, foi de 24%, abarcando quase na sua totalidade o domínio D1 (N-terminal), e em menor proporção regiões do domínio D2, e nenhuma semelhança na região C-terminal do domínio D3. Por outro lado, na sequência do inibidor BJ46a, é possível observar os primeiros 19 aminoácidos, os quais correspondem à sequência sinal com a qual a proteína é expressa, mas que não está presente na proteína madura (Valente *et al.*, 2001; Neves-Ferreira *et al.*, 2010). Assim mesmo, este fator BJ46a, exibe o *motif* NXS/T, factível de glicosilação, em quatro posições (76, 185, 263 e 274), frente a três (123, 185, e 263) que possui o HSF, e, mesmo o BaltMPI não apresentando nenhuma destas posições na sua sequência parcial, existe a possibilidade, como mencionado anteriormente, deste inibidor ser uma proteína glicosilada. Na figura 13, também é possível observar três resíduos de cisteína no BaltMPI, presentes nas mesmas posições no inibidor BJ46a (Valente *et al.*, 2001). Os SVMPIs da super família das cistatinas, caracterizam-se por possuir 12 resíduos de cisteína, que formam seis pontes dissulfeto, sendo o HSF a única exceção, pois possui 13 resíduos de cisteína na sua estrutura, estando o resíduo adicional na posição 44, posição na qual o BJ46a e o BaltMPI apresentam um resíduo de Val. Ou seja, existe uma grande possibilidade de que igualmente ao BJ46a, o BaltMPI, apresente unicamente 12 resíduos de cisteína, que é o normalmente observado nas proteínas da família a qual pertencem esses SVMPIs (Valente *et al.*, 2001).

O BaltMPI, apresentou um efeito inibitório sobre SVMPs da classe P-I e P-III, no entanto, antes de dar inicio ao seu processo de purificação, constatou-se o potencial do soro para inibir a ação hemorrágica de duas metaloproteases, a Batroxase, uma SVMP da classe P-I, e a BjussuMP-I, SVMP da classe P-III (Figura 5). A eleição da Batroxase para realização dos testes de inibição, com as frações obtidas em cada passo cromatográfico, direcionando assim a busca do inibidor de interesse, deveu-se a que é uma metaloprotease já caracterizada (Cintra *et al.*, 2012) e, a que era factível a sua purificação no laboratório de toxinologia da FCFRP-USP. A obtenção desta, a partir da peçonha da serpente *Bothrops atrox*, foi realizada seguindo a metodologia descrita por Cintra *et al.* (2012), a qual consistiu de três passos cromatográficos consecutivos: cromatografia em Sephacryl S200 (Figura 4A), Superdex™ 75 (Figura 4B) e ES-502N 7C (Figura 4C). A última cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Figura 4D), foi realizada com a única finalidade de avaliar o grau de pureza da protease isolada, pois este tipo de cromatografia, provoca a perda da atividade das metaloproteases, devido às condições ácidas nas quais é realizada (Odell *et al.*, 1998; Fox e Serrano, 2008). A metaloprotease da classe P-III, a BjussuMP-I, isolada previamente no laboratório de toxinologia, seguindo a metodologia descrita por Mazzi *et al.* (2004), também é uma metaloprotease já caracterizada e foi utilizada para avaliar a capacidade, tanto do soro quanto do BaltMPI, de inibir a atividade hemorrágica produzida por uma SVMP de outra classe.

O BaltMPI, mostrou inibir eficientemente a atividade hemorrágica da Batroxase, quando avaliada a inibição da atividade hemorrágica desta SVMP. Assim mesmo, inibiu eficientemente a atividade hemorrágica produzida pela BjussuMP-I. Porém, devido ao baixo rendimento do processo de purificação deste inibidor e ao dispendioso processo de purificação, estúdios adicionais, foram realizados unicamente entre o BaltMPI e a Batroxase. Neste sentido, foi determinado que para inibir a ação

hemorrágica produzida pela Batroxase, na sua DHM (10μg), são necessários 5μg do BaltMPI (Figura 14), quantidade que foi definida como a DIHM, ou seja, a mínima quantidade do inibidor necessária para inibir completamente a atividade da metaloprotease na sua DHM (Otero *et al.*, 1992). Agora, considerando-se as massas moleculares de cada um, é possível afirmar que a inibição resulta de uma relação estequiométrica entre o inibidor e a metaloprotease de 1:2, mesma relação estabelecida por Valente *et al.* (2001) para o fator BJ46a e as metaloproteases atrolysin C (classe P-I) e jararhagin (classe P-III). Enquanto que o fator anti-hemorrágico, HSF, consegui inibir as metaloproteases da peçonha autóloga, HR1 (Classe P-III) e HR2 (Classe P-I), em proporção de 1:1 (Omori-Satoh, 1977), e o fator BaSAH inibe a ação hemorrágica da BaH1 (principal metaloprotease hemorrágica da peçonha da serpente *Bothrops asper*) em uma proporção de 2:1 (Borkow *et al.*, 1995). Do mesmo modo, a partir da avaliação da inibição sobre a atividade hemorrágica da Batroxase (Figura 14) foram obtidos os dados que permitiram calcular a dose efetiva 50 (DE50%) do BaltMPI (Figura 15), determinada como 0,857μg, ou seja, nesta concentração, o halo hemorrágico produzido pela Batroxase na sua DHM, seria de 5 mm. E embora, ainda não exista este tipo de caracterização para os outros SVMPIs, que permita fazer uma comparação, é um dado útil e simples de calcular, o qual permitirá fazer uma avaliação rápida a respeito do potencial de inibição que possui um inibidor frente a determinada metaloprotease, e compará-lo com os valores de outros inibidores.

O mecanismo mediante o qual estes SVMPIs conseguem inibir a hemorragia, e algumas outras atividades das SVMPs, ainda não está esclarecido, e vários estudos a respeito das interações entre estas proteínas tem sido realizados com o intuito de entender melhor essas interações. Para isto, o tipo de complexação entre o inibidor e a metaloprotease foi inicialmente avaliado. Neste sentido, ao analisar o tipo de

complexação entre o BaltMPI e a Batroxase mediante SDS – PAGE (Figura 23), seguindo o método utilizado por Neves-Ferreira *et al.* (2007), foi possível observar que no gel as duas proteínas correram separadamente, e de forma similar ao próprio inibidor e metaloprotease utilizados como referência na mesma corrida eletroforética. Com isso, é possível afirmar que a interação entre as duas proteínas é do tipo não covalente (Catanese e Kress, 1992; Neves-Ferreira *et al.*, 1997; Valente *et al.*, 2001; Aoki *et al.*, 2007; Neves-Ferreira *et al.*, 2010). O mesmo tipo de interação não covalente entre o inibidor e a metaloprotease foi observada na caracterização dos outros SVMPIs, sendo esta mais uma característica deste grupo, pois mesmo sendo parte da super família das cistatinas, estes inibidores não possuem atividade proteolítica sobre estas, nem sobre as metaloproteases (Neves-Ferreira *et al.*, 2010).

Aoki *et al.* (2007), realizaram modificações estruturais do fator anti-hemorrágico HSF, e posteriormente avaliaram a inibição sobre SVMP. Inicialmente eles clivaram o inibidor, HSF, com papaína e brometo de cianogênio, e avaliaram a inibição da atividade hemorrágica de metaloproteases, sendo demonstrado que o domínio D1, o N-terminal ou domínios das cistatinas, é indispensável para a inibição da atividade hemorrágica. Além disso, também demonstraram que na formação do complexo inibidor – metaloprotease, três lisinas, nas posições 15, 41 e 103, as quais também estão presentes na sequência do BaltMPI, são protegidas contra modificações químicas, o que indica a sua participação na interação (Aoki *et al.*, 2007; Neves-Ferreira *et al.*, 2010). Adicionalmente, Valente *et al.* (2001), também demonstraram que a interação entre o inibidor e a metaloprotease, ocorre através do domínio catalítico destas últimas (Figura 3), pois o inibidor BJ46a, inibiu tanto a atividade hemorrágica da Atrolisyn C e da jararhagin, sendo a primeira da classe P-I e portanto possuindo unicamente o domínio catalítico das metaloproteases, e a segunda, uma SVMP da classe P-III, que além do domínio catalítico, tem domínios tipo desintegrina e

domínios ricos em cisteína. Além disto, os pesquisadores também avaliaram a complexação entre o BJ46a e jararhagin-C, uma proteína com sequência idêntica à jararhagin, mas carente do domínio catalítico, dessa forma evidenciaram que não se formou o complexo observado previamente entre a SVMP da classe P-III e o inibidor (Valente *et al.*, 2001).

A hemorragia é um dos efeitos decorrentes mais significativos das metaloproteases, mesmo assim, a relevância que elas possuem na fisiopatologia do acidente botrópico, não está limitada ao efeito hemorrágico *per rhexis*, pois elas são proteínas que possuem uma alta atividade biológica, podendo apresentar também atividade fibrinogenolítica, fibrinolítica, mionecrótica, inflamatória, proteolítica, não hemorrágica, apoptótica, entre outras (Markland, 1998; Fox e Serrano, 2008; Fox e Serrano, 2010; Escalante *et al.*, 2011). Assim mesmo, acredita se que esta atividade proteolítica das metaloproteases tem uma correlação positiva com o efeito hemorrágico destas proteases, devido a que é essa proteólise produzida sobre os diferentes componentes da membrana basal o que produz o efeito hemorrágico das SVMPs. Da mesma forma, as metaloproteases da classe P-III, que tem domínios adicionais ao domínio catalítico, único presente nas SVMPs da classe P-I, apresentam um efeito hemorrágico mais potente, do que aquele apresentado por estas últimas (Bjarnason e Fox, 1994; Kamiguti *et al.*, 1996; Fox e Serrano, 2010). Igualmente, muitas SVMPs possuem atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, que possui massa molecular de 340 kDa, sendo a sua estrutura glicoproteica constituída por três cadeias polipeptídicas duplas Aα, Bβ e a cadeia γ, as quais se encontram interligadas por pontes dissulfeto em um nódulo central (Lisman *et al.*, 2005; Adams e Bird, 2009). As SVMPs podem clivar tanto a cadeia α, quanto a cadeia β, porém, algumas apresentam preferência pela cadeia α (Markland, 1998). O fibrinogênio e a fibrina, produtos finais da cascata de coagulação, estão envolvidos no processo de agregação plaquetária e

na manutenção da homeostasia no organismo (Lisman *et al.*, 2005). Quando se produz uma lesão nos vasos sanguíneos, a cascata de coagulação é ativada por duas vias, a extrínseca e a intrínseca, que acabam se juntando em uma via comum que converte o fator X, em fator Xa, que uma vez ativo converte a protrombina em trombina, a qual tem entre suas funções, a clivagem do fibrinogênio para a produção de fibrina, que forma um coagulo no local da lesão, evitando assim a perda excessiva de sangue (Kamiguti *et al.*, 1996; Adams e Bird, 2009).

A Batroxase, além de ser uma SVMP hemorrágica, possui atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, clivando tanto a cadeia α, quanto a β (Figura 19), ainda assim, esta metaloprotease, pode exibir um efeito catalítico unicamente sobre a cadeia α do fibrinogênio, dependendo da concentração (Jurgilas *et al.*, 2003; Cintra *et al.*, 2012). Na avaliação da inibição do BaltMPI sobre a atividade proteolítica da metaloprotease sobre o fibrinogênio, foi observado que a Batroxase conseguiu clivar as duas cadeias, α e β, do fibrinogênio quando utilizados 10μg da protease (Figura 19A), enquanto que se observa uma redução na clivagem da cadeia β do fibrinogênio, quando utilizados 2μg da Batroxase (Figura 19B). Assim mesmo, também foram observados resultados diferentes na inibição da atividade proteolítica da Batroxase, segundo as concentrações utilizadas das proteínas. Quando avaliada a inibição do BaltMPI sobre a Batroxase, utilizando as suas DIHM (5μg) e DHM (10μg), respectivamente, não foi observado efeito inibitório sobre a ação proteolítica da Batroxase, pois as cadeias, α e β, do fibrinogênio foram clivadas pela Batroxase na presença do inibidor, da mesma forma que na ausência deste (Figura 19A). Já quando a atividade foi avaliada utilizando uma proporção molar inibidor (2μg) metaloprotease (1μg), 1:1, o BaltMPI conseguiu inibir a atividade proteolítica da Batroxase sobre ambas as cadeias, α e β, pois a clivagem deste pela Batroxase na ausência do inibidor, onde a cadeia α foi clivada completamente, e a cadeia β, parcialmente, em comparação ao resultado na

presença do inibidor, onde, mesmo não sendo observadas as cadeias na mesma intensidade do controle de fibrinogênio, se observam as três cadeias deste, entre elas a cadeia α, a qual foi clivada pela Batroxase na ausência do inibidor (Figura 19B). Sendo este resultado similar ao observado por Jurgilas *et al.* (2003), que descreveram a inibição que o fator anti-hemorrágico PO41, apresentou sobre a atividade proteolítica da jararhagin sobre o fibrinogênio, a qual foi completamente inibida ao ser avaliada utilizando quantidades equimolares do inibidor e da metaloprotease (Jurgilas *et al.*, 2003). Igualmente, tem sido descrita a inibição da ação proteolítica de SVMPs sobre o fibrinogênio, que exercem alguns fatores anti-hemorrágicos. Jurgilas *et al.* (1999) que, evidenciaram a presença de fatores antibotrópicos (ABF) no leite materno de gambás (*Didelphis marsupialis*), demonstraram o efeito inibitório que este fator, ABF, possui sobre a atividade proteolítica que a peçonha bruta da serpente *Bothrops* jararaca, tem sobre o fibrinogênio, fibrina, colágeno tipo IV, laminina e fibrinectina (Jurgilas *et al.*, 1999). Os mecanismos envolvidos na inibição que apresentam os SVMPIs sobre a atividade proteolítica destas proteases, ainda não são conhecidos. Igualmente, não estão claros os mecanismos pelos quais as SVMPs exercem seus efeitos hemorrágicos e proteolíticos, porém, com as observações descritas é possível afirmar que é bastante factível que, como proposto por outros autores, em cada uma das atividades biológicas das metaloproteases podem não estar envolvidos os mesmos domínios estruturais (Bjarnason e Fox, 1994; Kamiguti *et al.*, 1996; Neves-Ferreira *et al.*, 2010). Desta forma, também é factível acreditar que, não é um único tipo de interação entre, os SVMPIs e as SVMPs, a responsável pelos efeitos inibitórios que os primeiros tem sobre as diversas atividades biológicas destas últimas, e sim o resultado de inúmeras interações entre diferentes sítios estruturais de ambas proteínas, mediante a formação do complexo por ligações não covalentes, o que resulta nos efeitos inibitórios observados.

A avaliação da inibição pelo BaltMPI da atividade proteolítica da Batroxase sobre o fibrinogênio, foi seguida da avaliação da inibição da atividade proteolítica da Batroxase sobre outros substratos, sendo eles fibrina e azocaseína. O BaltMPI apresentou uma inibição significativa sobre a ação que a Batroxase tem sobre estes dois substratos. Na avaliação da inibição da atividade fibrinolítica da Batroxase, foram utilizados dois controles positivos, um foi a mesma metaloprotease, para avaliar a sua atividade proteolítica sobre a fibrina, e um outro controle positivo foi a plasmina, pois esta é uma proteína que também participa na cascata de coagulação, sendo uma das suas funções a degradação da fibrina presente no coágulo formado durante a fase final da cascata, e sendo utilizada na atividade, para confirmar a presença de fibrina na placa, a qual é obtida pela clivagem do fibrinogênio no momento de elaborar a placa para a atividade. Enquanto que na avaliação da inibição da atividade azocaseinolítica da Batroxase, foi utilizado, além do controle positivo com a própria Batroxase, um controle de inibição com EDTA, que possui um forte efeito inibitório e amplamente conhecido sobre as SVMPs, por ser um agente quelante do íon zinco do qual as metaloproteases dependem para ser biologicamente ativas. Nestas avaliações, foi evidenciada a capacidade do BaltMPI para inibir a atividade proteolítica que a Batroxase possui sobre a fibrina (Figura 20) e a azocaseína (Figura 21), sendo evidenciado que, a inibição da atividade azocaseinolítica da Batroxase foi dose dependente. Outros autores também tem observado a inibição que apresentam sobre a atividade proteolítica de, SVMPs ou da peçonha bruta, alguns SVMPIs. Exemplo disto são os inibidores, DM40 e DM43, isolados a partir do soro do *Didelphis marsupialis*, que inibiram a atividade proteolítica da peçonha da *Bothrops jararaca* sobre o fibrinogênio e a fibrina (Neves-Ferreira *et al.*, 2000). Os fatores anti-hemorrágicos cMSF e jMSF, inibiram a ação de SVMP da classe P-I e P-III sobre a caseína (Aoki *et al.*, 2008). No entanto, a avaliação da inibição da atividade proteolítica das SVMPs, também sido avaliada utilizando substratos diferentes, conforme descrito

por Valente *et al.* (2001) ao determinar que o fator anti-hemorrágico BJ46a inibe a atividade proteolítica das SVMPs, atrolysin C e jararhagin, sobre o substrato fluorogênico Abz-Ala-Gly-Leu-Ala-Nba (Valente *et al.*, 2001). Sobre esse mesmo substrato sintético, o qual é similar ao sítio ativo de várias colagenases de vertebrados (Fox *et al.* 1986), Jurgilas *et al.* (2003), evidenciaram a inibição apresentada pelo fator anti-hemorrágico PO41 sobre a atividade proteolítica da jararahagin (Jurgilas *et al.*, 2003).

Outra característica que tem sido atribuída aos SVMPIs, é a sua inibição específica sobre as SVMPs (Domont *et al.*, 1991; Borkow *et al.*, 1995; Omori-Satoh *et al.*, 2000; Valente *et al.*, 2001). Com o intuito de evidenciar esta propriedade no inibidor BaltMPI, foi avaliada a ação proteolítica de uma metaloprotease, Batroxase, e de uma serinoprotease, BjSP, sobre o fibrinogênio, assim como, a ação proteolítica de ambas proteases sobre o mesmo substrato na presença do BaltMPI. É importante ressaltar que as serinoproteases, também estão presentes na peçonha de serpentes, exibindo variadas atividades biológicas, estando entre as mais relevantes a sua ação sobre diversos fatores da cascata de coagulação, afetando a homeostasia (Serrano e Maroun, 2005), sendo este o motivo para avaliar, se igualmente às metaloproteases, a BjSP, é inibida pelo BaltMPI. Neste sentido, foi evidenciado que tanto a metaloprotease, quanto a serinoprotease, degradaram o fibrinogênio (Figura 22). No entanto, na presença do BaltMPI, a ação da Batroxase sobre o fibrinogênio foi inibida, enquanto a ação da serinoprotease não foi alterada pela presença do inibidor. Esta inibição específica sobre as metaloproteases também foi evidenciada com os fatores HSF, BJ46a e MSFs (Yamakawa e Omorisatoh, 1992; Valente *et al.*, 2001; Aoki *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2012).

Com este resultado, e conjuntamente com todos os outros obtidos até agora no presente trabalho, sobre a caracterização bioquímica, funcional do BaltMPI, é possível

afirmar que a proteína se trata de um SVMPI. Por outro lado, mesmo sendo esta caracterização ainda parcial, foi avaliado o potencial do BaltMPI como complemento à soroterapia, única terapia utilizada nos acidentes ofídicos e que, mesmo sendo efetiva no tratamento dos efeitos sistêmicos do envenenamento, quando utilizada adequadamente, apresenta várias desvantagens com respeito ao tratamento dos efeitos locais, especialmente no envenenamento botrópico, o qual representa a maioria dos acidentes ofídicos no país (Figura 2). Mediante a avaliação da inibição da atividade hemorrágica da Batroxase, sem realizar uma incubação prévia com o inibidor (Figura 16), foi possível observar que, mesmo sem a incubação previa entre o inibidor e a metaloprotease, o BaltMPI tem um efeito inibitório sobre a ação hemorrágica da Batroxase. Agora, para explicar se são possíveis fatores de temperatura, tempo ou concentração das proteínas, os que influenciam a diferença dos resultados na inibição da ação hemorrágica da Batroxase, é preciso realizar maiores estudos com ambas proteínas. Porém, poderia ser provável que as condições utilizadas na incubação prévia, 30 minutos a 37°C, favoreçam a formação do complexo, tornando assim mais eficiente a inibição sobre a protease. Assim mesmo, ao avaliar a inibição da atividade hemorrágica da Batroxase, ao injetar o inibidor no dorso dos camundongos tempo depois de ter injetado a protease, foi evidenciada uma inibição significativa da hemorragia produzida pela metaloprotease, quando o inibidor foi injetado 0 minutos após da injeção da Batroxase no dorso dos camundongos (Figura 17). Inibição que, no caso da injeção do BaltMPI 10 minutos depois da Batroxase, não foi observada, sendo evidenciada uma hemorragia muito similar à produzida pela Batroxase controle. Embora ainda não sejam conhecidos com muita clareza os mecanismos das SVMPs, nem dos SVMPIs, e sejam necessários estudos adicionais sobre o BaltMPI, e outros SVMPIs, para poderem ser utilizados como complemento à soroterapia, assim como para entender melhor as interações destes com as SVMPs, está evidenciado o potencial que estes SVMPIs tem, não só no campo dos acidentes ofídicos, mas

também como ferramentas moleculares, que a medida que são utilizados para compreender melhor o mecanismo de ação de outras moléculas, por exemplo SVMPs, também eles mesmos se tornam mais conhecidos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Foi isolado com alto grau de pureza, a partir do soro da serpente *Bothrops alternatus*, um inibidor de metaloproteases (SVMPI), denominado BaltMPI, mediante cromatografia em DEAE Sepharose™, Superdex™ 200, MonoQ™ 5/50 GL e cromatografia de fase reversa em C18, com uma recuperação proteica de 0,3%.

- O BaltMPI apresentou massa molecular por SDS - PAGE de 60,5 kDa, e por espectrometria de massas MALDI/TOF de 42,4 kDa. Seu ponto isoelétrico, determinado por focalização isoelétrica, é de 5,27. Portanto, o BaltMPI é um SVMPIs com caráter ácido, pertencente aos SVMPIs de baixa massa molecular.

- Os primeiros 60 aminoácidos da região N-terminal do BaltMPI, determinados mediante degradação de Edman, apresentou alto grau de homologia com a sequência para a mesma região de outros SVMPIs isolados a partir do soro de serpentes peçonhentas. Outros segmentos da sequência, determinados após clivagem com tripsina e análise por espectrometria de massas e posterior alinhamento da sequência parcial, determinada para o BaltMPI, com a sequência do BJ46a, um SVMPI proveniente da *Bothrops jararaca*, demonstrou alta homologia entre elas.

- Tanto o soro da serpente, quanto o inibidor, BaltMPI, inibiram a atividade hemorrágica da Batroxase, uma SVMP da classe P-I, e a da BjussuMP-I, uma SVMP da classe P-III. Já, em relação à DHM da Batroxase, foi determinado que o BaltMPI tem uma DIHM de 5μg, e uma CE50% de 0,857μg.

- O BaltMPI também inibiu a ação proteolítica da Batroxase, sobre os substratos: fibrinogênio, fibrina e azocaseína.

- O BaltMPI não inibiu a atividade fibrinogenolítica da serinoprotease BjSP, corroborando assim com a especificidade descrita para inibir as SVMPs que possuem os SVMPIs.

- O BaltMPI inibe a ação hemorrágica e proteolítica da Batroxase, ao formar um complexo mediante ligações não covalentes com esta SVMP.

- O inibidor BaltMPI, igualmente aos demais SVMPIs descritos, é estável em uma ampla faixa de pH (1 – 9), e a temperaturas elevadas, sendo que em temperaturas acima de 60°C observa-se diminuição na sua capacidade de inibir a atividade hemorrágica da Batroxase.

- A inibição da atividade hemorrágica da Batroxase, quando avaliado o potencial do BaltMPI como complemento à soroterapia, foi menor comparativamente à inibição observada ao realizar os testes com incubação prévia entre o inibidor e a metaloprotease. No entanto, os resultados obtidos são promissores, confirmando o grande potencial que estas proteínas, os SVMPIs, possuem, tanto como ferramentas moleculares, como opção para o tratamento dos acidentes ofídicos, em especial o acidente botrópico, no qual as SVMPs tem papel fundamental na fisiopatologia observada e que conduz à alta morbidade associada com este tipo de acidente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.L.C. & BIRD, R.J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology,* 14**,** 462-470. 2009.

AOKI, N., DESHIMARU, M. & TERADA, S. Active fragments of the antihemorrhagic protein HSF from serum of habu (Trimeresurus flavoviridis). *Toxicon,* 49**,** 653-662. 2007.

AOKI, N., TSUTSUMI, K., DESHIMARU, M. & TERADA, S. Properties and cDNA cloning of antihemorrhagic factors in sera of Chinese and Japanese mamushi (Gloydius blomhoffi). *Toxicon,* 51**,** 251-261. 2008.

ASEGA, A.F., OLIVEIRA, A.K., MENEZES, M.C., NEVES-FERREIRA, A.G.C. & SERRANO, S.M.T. Interaction of Bothrops jararaca venom metalloproteinases with protein inhibitors. *Toxicon,* 80**,** 1-8. 2014.

BALDO, C., JAMORA, C., YAMANOUYE, N., ZORN, T.M. & MOURA-DA-SILVA, A.M. Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis. *Plos Neglected Tropical Diseases,* 4. 2010.

BARAMOVA, E.N., SHANNON, J.D., BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. Degradation of Extracellular-Matrix Proteins by Hemorrhagic Metalloproteinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 275**,** 63-71. 1989.

BARCHAN, D., KACHALSKY, S., NEUMANN, D., VOGEL, Z., OVADIA, M., KOCHVA, E. & FUCHS, S. How the Mongoose can Fight the Snake - The Binding-Site of the Mongoose Acetylcholine-Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 89**,** 7717-7721. 1992.

BERNARDE, P.S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. *Gazeta Médica da Bahia.* 55 - 63. 2011.

BIARDI, J.E. & COSS, R.G. Rock squirrel (Spermophilus variegatus) blood sera affects proteolytic and hemolytic activities of rattlesnake venoms. *Toxicon,* 57**,** 323-331. 2011.

BIARDI, J.E., HO, C.Y.L., MARCINCZYK, J. & NAMBIAR, K.P. Isolation and identification of a snake venom metalloproteinase inhibitor from California ground squirrel (Spermophilus beecheyi) blood sera. *Toxicon,* 58**,** 486-493. 2011.

BIONDO, R., PEREIRA, A.M.S., MARCUSSI, S., PEREIRA, P.S., FRANCA, S.C. & SOARES, A.M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some

snake venoms and toxins by Mandevilla velutina (Apocynaceae) aqueous extract. *Biochimie,* 85**,** 1017-1025. 2003.

BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. Hemorrhagic Metalloproteinases from Snake-Venoms. *Pharmacology & Therapeutics,* 62**,** 325-372. 1994.

BOCHNER, R. & STRUCHINER, C.J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. *Cadernos de Saúde Pública,* 18**,** 735-746. 2002.

BOCHNER, R. & STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cadernos de Saúde Pública,* 19**,** 07-16. 2003.

BOLDRINI-FRANCA, J., CORREA-NETTO, C., SILVA, M.M.S., RODRIGUES, R.S., DE LA TORRE, P., PEREZ, A., SOARES, A.M., ZINGALI, R.B., NOGUEIRA, R.A., RODRIGUES, V.M., SANZ, L. & CALVETE, J.J. Snake venomics and antivenomics of Crotalus durissus subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *Journal of Proteomics,* 73**,** 1758-1776. 2010.

BORGES, M.H., SOARES, A.M., RODRIGUES, V.M., ANDRIAO-ESCARSO, S.H., DINIZ, H., HAMAGUCHI, A., QUINTERO, A., LIZANO, S., GUTIÉRREZ, J.M., GIGLIO, J.R. & HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of Casearia sylvestris (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A(2). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology,* 127**,** 21-30. 2000.

BORGES, M.H., SOARES, A.M., RODRIGUES, V.M., OLIVEIRA, F., FRANSHESCHI, A.M., RUCAVADO, A., GIGLIO, J.R. & HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from Casearia sylvestris (Flacourtiaceae). *Toxicon,* 39**,** 1863-1869. 2001.

BORKOW, G., GUTIÉRREZ, J.M. & OVADIA, M. Isolation, characterization and mode of neutralization of a potent antihemorrhagic factor from the serum of the snake bothrops-asper. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects,* 1245**,** 232-238. 1995.

CALVETE, J.J., MARCINKIEWICZ, C., MONLEON, D., ESTEVE, V., CELDA, B., JUAREZ, P. & SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon,* 45**,** 1063-1074. 2005.

CALVETE, J.J., JUÁREZ, P. & SANZ, L. Snake Venomics and Disintegrins Portrait and Evolution of a Family of Snake Venom Integrin Antagonists. In: Mackessy, S. P. (Ed).Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, FL.: CRC Press. Taylor & Francis Group., 337 - 353. 2010.

CALVETE, J.J., SANZ, L., PEREZ, A., BORGES, A., VARGAS, A.M., LOMONTE, B., ANGULO, Y., MARIA GUTIÉRREZ, J., CHALKIDIS, H.M., MOURAO, R.H.V.,

FURTADO, M.F.D. & MOURA-DA-SILVA, A.M. Snake population venomics and antivenomics of Bothrops atrox: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *Journal of Proteomics,* 74**,** 510-527. 2011.

CARONE, S.E.I., CAETANO, R.C., FORTUNATO, L.F., FRANCO, J.J., SARTIM, M.A., SANTOS-FILHO, N.A., MENALDO, D.L., SAMPAIO, S.V. Isolation and characterization of a serine protease from *Bothrops jararaca* snake venom. In: XI Congree os the Pan-American Section of International Society Of Toxinology. XII Congress of the Brazilian Society of Toxinology. Guaruja – SP. p. 152. 2013.

CARRASCO, P.A., MATTONI, C.I., LEYNAUD, G.C. & SCROCCHI, G.J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta,* 41**,** 109-124. 2012.

CATANESE, J.J. & KRESS, L.F. Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human alpha-1b-glycoprotein. *Biochemistry,* 31**,** 410-418. 1992.

CERDAS, L. & LOMONTE, B. Study of the ophiophagic capacity and resistance of zopilota (clelia-clelia, colubridae) of costa-rica to the venom of serpents. *Toxicon,* 20**,** 936-939. 1982.

CHAVES, F., LORIA, G.D., SALAZAR, A. & GUTIÉRREZ, J.M. Intramuscular administration of antivenoms in experimental envenomation by Bothrops asper: comparison between Fab and IgG. *Toxicon,* 41**,** 237-244. 2003.

CHIPPAUX, J.P., WILLIAMS, V. & WHITE, J. Snake-venom variability - methods of study, results and interpretation. *Toxicon,* 29**,** 1279-1303. 1991.

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

COSTA, J.D.O., BALDO, C., HAMAGUCHI, A., BRANDEBURGO, M.I.H. & DE OLIVEIRA, F. Purificação de uma enzima fibrinogenolítica da peçonha da serpente *Bothrops alternatus.* Bioscience Journal, 147-153. 2003.

CRUZ, L.S., VARGAS, R. & LOPES, A.A. Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethnicity & Disease,* 19**,** 42-46. 2009.

DA SILVA, J.O., COPPEDE, J.S., FERNANDES, V.C., SANT'ANA, C.D., TICLI, F.K., MAZZI, M.V., GIGLIO, J.R., PEREIRA, P.S., SOARES, A.M. & SAMPAIO, S.V. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from Pentaclethra macroloba. *Journal of Ethnopharmacology,* 100**,** 145-152. 2005.

DA SILVA, J.O., FERNANDES, R.S., TICLI, F.K., OLIVEIRA, C.Z., MAZZI, M.V., FRANCO, J.J., GIULIATTI, S., PEREIRA, P.S., SOARES, A.M. & SAMPAIO, S.V. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from Pentaclethra macroloba. *Toxicon,* 50**,** 283-291. 2007a.

DA SILVA, N.M.V., ARRUDA, E.Z., MURAKAMI, Y.L.B., MORAES, R.A.M., EL-KIK, C.Z., TOMAZ, M.A., FERNANDES, F.F.A., OLIVEIRA, C.Z., SOARES, A.M., GIGLIO, J.R. & MELO, P.A. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by Bothrops snarce venoms in a mouse model. *Toxicon,* 50**,** 196-205. 2007b.

DE SOUZA, W. Doenças negligenciadas. Academia Brasileira de Ciências., 34 – 38. 2010.

DESHIMARU, M., TANAKA, C., FUJINO, K., AOKI, N., TERADA, S., HATTORI, S. & OHNO, M. Properties and cDNA cloning of an antihemorrhagic factor (HSF) purified from the serum of Trimeresurus flavoviridis. *Toxicon,* 46**,** 937-945. 2005.

DESHIMARU, M., TANAKA, C., TOKUNAGA, A., GOTO, M. & TERADA, S. Efficient Method for Purification of Antihemorrhagic Factor (HSF) in the Serum of Japanese Habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Fukuoka Univ. Sci. Rep.,* 33**,** 45 - 53. 2003.

DEY, A. & DE, J.N. Phytopharmacology of Antiophidian Botanicals: A Review. *International Journal of Pharmacology,* 8**,** 62-79. 2012.

DOMONT, G.B., PERALES, J. & MOUSSATCHE, H. Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon,* 29**,** 1183-1194. 1991.

EDGAR, W. & PRENTICE, C.R.M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. *Thrombosis Research,* 2**,** 85 -95. 1973.

EDMAN, P. & BEGG, G. A Protein Sequenator. *European Journal of Biochemistry,* 1**,** 80 - 91. 1967.

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

FENWICK, A.M., GUTBERLET, R.L., JR., 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,* 156**,** 617-640. 2009.

FERREIRA, P.M.P., COSTA-LOTUFO, L.V., MORAES, M.O., BARROS, F.W.A., MARTINS, A.M.A., CAVALHEIRO, A.J., BOLZANI, V.S., SANTOS, A.G. & PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of Casearia sylvestris:

a medicinal review. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias,* 83**,** 1373-1384. 2011.

FOX, J.W., CAMPBELL, R., BEGGERLY, L. & BJARNASON, J.B. Substrate specificities and inhibition of 2 hemorrhagic zinc proteases ht-c and ht-d from crotalus-atrox venom. *European Journal of Biochemistry,* 156**,** 65-72. 1986.

FOX, J.W. & SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon,* 45**,** 969-985. 2005.

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

FOX, J.W. & SERRANO, S.M.T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of Proteomics,* 72**,** 200-209. 2009.

FOX, J.W. & SERRANO, S.M.T. Snake Venom Metalloproteinases. In: Mackessy, S. P. (Ed).Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, FL.: CRC Press, Taylor & Francis Group., 95 - 114. 2010.

FRANCISCHETTI, I.M.B., GOMBAROVITS, M.E.C., VALENZUELA, J.G., CARLINI, C.R. & GUIMARAES, J.A. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology,* 127**,** 23-36. 2000.

FUNASA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. . *Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância Epidemiológica.* 2001.

GAY, C.C., MARUNAK, S.L., TEIBLER, P., RUIZ, R., ACOSTA DE PEREZ, O.C. & LEIVA, L.C. Systemic alterations induced by a Bothrops alternatus hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. *Toxicon,* 53**,** 53-59. 2009.

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

GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVADO, A., ESCALANTE, T. & DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon,* 45**,** 997-1011. 2005.

GUTIÉRREZ, J.M., THEAKSTON, R.D.G. & WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *Plos Medicine,* 3**,** 727-731. 2006.

GUTIÉRREZ, J., RUCAVADO, A., CHAVES, F., DIAZ, C. & ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by Bothrops asper snake venom. *Toxicon,* 54**,** 958-975. 2009.

GUTIÉRREZ, J., WILLIAMS, D., FAN, H.W. & WARRELL, D.A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon,* 56**,** 1223-1235. 2010a.

GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVADO, A. & ESCALANTE, T. Snake Venom Metalloproteinases: Biological Roles and Participation in the Pathophysiology of Envenomation. In: Mackessy, S. P. (Ed).Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, FL.: CRC Press. Taylor & Francis Group., 115 - 138. 2010b.

GUTIÉRREZ, J., LEON, G. & BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals,* 39**,** 129-142. 2011.

GUTIÉRREZ, J.M. Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases,* 20**,** 1-9. 2014.

HARRISON, R.A., HARGREAVES, A., WAGSTAFF, S.C., FARAGHER, B. & LALLOO, D.G. Snake Envenoming: A Disease of Poverty. *Plos Neglected Tropical Diseases,* 3. 2009.

HAWGOOD, B.J. Abbé Felice Fontana (1730-1805) Founder of Modern Toxinology. *Toxicon,* 33**,** 591-601. 1995.

JACKSON, K. The evolution of venom-conducting fangs: Insights from developmental biology. *Toxicon,* 49**,** 975-981. 2007.

JESPERSEN, J. & ASTRUP, T. A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents - optimal conditions, reproducibility and precision. *Haemostasis,* 13**,** 301-315. 1983.

JURGILAS, P.B., NEVES-FERREIRA, A.G.C., DOMONT, G.B., MOUSSATCHE, H. & PERALES, J. Detection of an antibothropic fraction in opossum (Didelphis marsupialis) milk that neutralizes Bothrops jararaca venom. *Toxicon,* 37**,** 167-172. 1999.

JURGILAS, P.B., NEVES-FERREIRA, A.G.C., DOMONT, G.B. & PERALES, J. PO41, a snake venom metalloproteinase inhibitor isolated from Philander opossum serum. *Toxicon,* 42**,** 621-628. 2003.

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

KASTURIRATNE, A., WICKREMASINGHE, A.R., DE SILVA, N., GUNAWARDENA, N.K., PATHMESWARAN, A., PREMARATNA, R., SAVIOLI, L., LALLOO, D.G. & DE SILVA, H.J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *Plos Medicine,* 5**,** 1591-1604. 2008.

KEMPARAJU, K., GIRISH, K.S. & NAGARAJU, S. Hyaluronidases, a Neglected Class of Glycosidases from Snake Venom Beyond a Spreading Factor. In: Mackessy, S. P. (Ed).Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, FL.: CRC Press. Taylor & Francis Group., 237 - 254. 2010.

KILMON SR, J.A. High tolerance to snake venom by the Virginia opossum, Didelphis virginiana. *Toxicon,* 14**,** 337-340. 1976.

KINI, R.M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis,* 34**,** 200-204. 2005.

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

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

LEITAO, D.P.S., POLIZELLO, A.C.M. & ROTHSCHILD, Z. Coagulation and fibrinolysis in capybara (Hydrochaeris hydrochaeris), a close relative of the guinea-pig (Cavia porcellus). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology,* 125**,** 113-120. 2000.

LISMAN, T., WEETERINGS, C. & DE GROOT, P.G. Platelet aggregation: Involvement of thrombin and fibrin(ogen). *Frontiers in Bioscience,* 10**,** 2504-2517. 2005.

LOMONTE, B., CERDAS, L., GENE, J.A. & GUTIÉRREZ, J.M. Neutralization of local-effects of the terciopelo (bothrops-asper) venom by blood-serum of the colubrid snake clelia-clelia. *Toxicon,* 20**,** 571-579. 1982.

MAGRIOTI, V. & KOKOTOS, G. Phospholipase A(2) inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents,* 20**,** 1-18. 2010.

MANNING, M.C. Sequence-analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from agkistrodon contortrix contortrix. *Toxicon,* 33**,** 1189-1200. 1995.

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

MARKLAND, F.S., JR. & SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon,* 62**,** 3-18. 2013.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. *Toxicon,* 30**,** 1131-1142. 1992.

MAZZI, M.V., MARCUSSI, S., CARLOS, G.B., STABELI, R.G., FRANCO, J.J., TICLI, F.K., CINTRA, A.C.O., FRANCA, S.C., SOARES, A.M. & SAMPAIO, S.V. A

new hemorrhagic metalloprotease from Bothrops jararacussu snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon,* 44**,** 215-223. 2004.

MEIER, J. Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (bothrops-atrox). *Toxicon,* 24**,** 41-46. 1986.

MENCHACA, J.M. & PEREZ, J.C. The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in opossum (didelphis-virginiana) serum. *Toxicon,* 19**,** 623-632. 1981.

MILWARD, E.A., FITZSIMMONS, C., SZKLARCZYK, A. & CONANT, K. The matrix metalloproteinases and CNS plasticity: An overview. *Journal of Neuroimmunology,* 187**,** 9-19. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por Animais Peçonhentos. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª Edição. Caderno 14. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2009.

MORS, W.B., DO NASCIMENTO, M.C., PEREIRA, B.M.R. & PEREIRA, N.A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. *Phytochemistry,* 55**,** 627-642. 2000.

NAGASE, H. Metalloproteases. In: Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc. 2001.

NAVES DE SOUZA, D.L., GOMES, M.S.R., FERREIRA, F.B., RODRIGUES, R.S., ACHE, D.C., RICHARDSON, M., BORGES, M.H. & RODRIGUES, V.M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from Bothropoides pauloensis snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology,* 161**,** 102-109. 2012.

NEVES-FERREIRA, A.G.C., PERALES, J., OVADIA, M., MOUSSATCHE, H. & DOMONT, G.B. Inhibitory properties of the antibothropic complex from the South American opossum (Didelphis marsupialis) serum. *Toxicon,* 35**,** 849-863. 1997.

NEVES-FERREIRA, A.G.C., CARDINALE, N., ROCHA, S.L.G., PERALES, J. & DOMONT, G.B. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from Didelphis marsupialis serum. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects,* 1474**,** 309-320. 2000.

NEVES-FERREIRA, A.G.C., VALENTE, R.H., PERALES, J. & DOMONT, G.B. Natural Inhibitors: Innate Immunity to Snake Venoms. In: Mackessy, S. P. (Ed).Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Boca Raton, FL.: CRC Press. Taylor & Francis Group. 2010.

NORI, J., CARRASCO, P.A. & LEYNAUD, G.C. Venomous snakes and climate change: ophidism as a dynamic problem. *Climatic Change,* 122**,** 67-80. 2014.

ODELL, G.V., FERRY, E.C., VICK, L.M., FENTON, A.W., DECKER, L.S., COWELL, R.L., OWNBY, C.L. & GUTIÉRREZ, J.M. Citrate inhibition of snake venom proteases. *Toxicon,* 36**,** 1801-1806. 1998.

OMORI-SATOH, T., SADAHIRO, S., OHSAKA, A. & MURATA, R. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of Trimeresurus flavoviridis, a crotalid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure,* 285**,** 414-426. 1972.

OMORI-SATOH, T. Antihemorrhagic factor as a proteinase inhibitor isolated from the serum of Trimeresurus flavoviridis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure,* 495**,** 93-98. 1977.

OMORI-SATOH, T., YAMAKAWA, Y. & MEBS, D. The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (Erinaceus europaeus), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. *Toxicon,* 38**,** 1561-1580. 2000.

OTERO, R., OSORIO, R.G., VALDERRAMA, R. & GIRALDO, C.A. Pharmacological and enzymatic effects of the snakes venoms of Antioquia and Choco (Colombia). *Toxicon,* 30**,** 611-620. 1992.

OTERO, R., FONNEGRA, R., JIMENEZ, S.L., NUNEZ, V., EVANS, N., ALZATE, S.P., GARCIA, M.E., SALDARRIAGA, M., DEL VALLE, G., OSORIO, R.G., DIAZ, A., VALDERRAMA, R., DUQUE, A. & VELEZ, H.N. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part I: Traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology,* 71**,** 493-504. 2000.

OTERO, R., GUTIÉRREZ, J., MESA, M.B., DUQUE, E., RODRIGUEZ, O., ARANGO, J.L., GOMEZ, F., TORO, A., CANO, F., RODRIGUEZ, L.M., CARO, E., MARTINEZ, J., CORNEJO, W., GOMEZ, L.M., URIBE, F.L., CARDENAS, S., NUNEZ, V. & DIAZ, A. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon,* 40**,** 1107-1114. 2002.

OTERO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of Bothrops asper bites. *Toxicon,* 54**,** 998-1011. 2009.

PAES LEME, A.F., SHERMAN, N.E., SMALLEY, D.M., SIZUKUSA, L.O., OLIVEIRA, A.K., MENEZES, M.C., FOX, J.W. & SERRANO, S.M.T. Hemorrhagic Activity of HF3, a Snake Venom Metalloproteinase: Insights from the Proteomic Analysis of Mouse Skin and Blood Plasma. *Journal of Proteome Research,* 11**,** 279-291. 2012.

PARIDA, S.P., DUTTA, S.K. & PAL, A. Hematology and plasma biochemistry of wild-caught Indian cobra Naja naja (Linnaeus, 1758). *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases,* 20. 2014.

PERALES, J., MOUSSATCHE, H., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B. & DOMONT, G.B. Isolation and partial characterization of an anti-bothropic complex from the serum of south-american didelphidae. *Toxicon,* 32**,** 1237-1249. 1994.

PERALES, J., NEVES-FERREIRA, A.G.C., VALENTE, R.H. & DORNONT, G.B. Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon,* 45**,** 1013-1020. 2005.

PEREZ, J.C. & SANCHEZ, E.E. Natural protease inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. *Toxicon,* 37**,** 703-728. 1999.

PINHO, F.M.O. & PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Rev Ass Med Brasil,* 47**,** 24 - 29. 2001.

PODUSLO, J.F. Glycoprotein molecular-weight estimation using sodium dodecyl sulfate-pore gradient electrophoresis - comparison of tris-glycine and tris-borate-edta buffer systems. *Analytical Biochemistry,* 114**,** 131-139. 1981.

PORTO, B.N., TELLI, C.A., DUTRA, T.P., ALVES, L.S., BOZZA, M.T., FIN, C.A., THIESEN, F.V. & RENNER, M.F. Biochemical and biological characterization of the venoms of Bothriopsis bilineata and Bothriopsis taeniata (Serpentes : Viperidae). *Toxicon,* 50**,** 270-277. 2007.

PROVERBIO, D., DE GIORGI, G.B., DELLA PEPA, A., BAGGIANI, L., SPADA, E., PEREGO, R., COMAZZI, C. & BELLOLI, A. Preliminary evaluation of total protein concentration and electrophoretic protein fractions in fresh and frozen serum from wild Horned Vipers (Vipera ammodytes ammodytes). *Veterinary Clinical Pathology,* 41**,** 582-586. 2012.

QUEIROZ, G.P., PESSOA, L.A., PORTARO, F.C.V., FURTADO, M.D.F.D. & TAMBOURGI, D.V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. *Toxicon,* 52**,** 842-851. 2008.

RAMOS, O.H.P. & SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Identification of metalloprotease gene families in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology,* 24**,** 285-290. 2001.

RAMOS, O.H.P. & SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology,* 142**,** 328-346. 2006.

RAWLINGS, N.D. & BARRETT, A.J. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *Journal of Molecular Evolution,* 30**,** 60-71. 1990.

RAWLINGS, N.D., TOLLE, D.P. & BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal,* 378**,** 705-716. 2004.

RAWLINGS, N.D., WALLER, M., BARRETT, A.J. & BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research,* 42**,** D503-D509. 2014.

RODRIGUES, V.M., SOARES, A.M., GUERRA-SA, R., RODRIGUES, V., FONTES, M.R.M. & GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from Bothrops neuwiedi snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 381**,** 213-224. 2000.

SAAD, E., BARROS, L.C., BISCOLA, N., PIMENTA, D.C., BARRAVIERA, S.R.C.S., BARRAVIERA, B. & FERREIRA, R.S., JR. Intraspecific variation of biological activities in venoms from wild and captive Bothrops jararaca. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues,* 75**,** 1081-1090. 2012.

SAJEVIC, T., LEONARDI, A. & KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon,* 57**,** 627-645. 2011.

SALDARRIAGA, M.M., OTERO, R., NUNEZ, V., TORO, M.F., DIAZ, A. & GUTIÉRREZ, J.M. Ontogenetic variability of Bothrops atrox and Bothrops asper snake venoms from Colombia. *Toxicon,* 42**,** 405-411. 2003.

SALLANTIN, M., HUET, J.C., DEMARTEAU, C. & PERNOLLET, J.C. Reassessment of commercially available molecular-weight standards for peptide sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis using electroblotting and microsequencing. *Electrophoresis,* 11**,** 34-36. 1990.

SANCHEZ, E.E. & RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Inhibitors of Snake Venoms and Development of New Therapeutics. *Immunopharmacology and Immunotoxicology,* 30**,** 647-678. 2008.

SCOPES, R.K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205-nm. *Analytical Biochemistry,* 59**,** 277-282. 1974.

SCOPUS. http://www.scopus.com/. Acessado o dia 21 de abril de 2014.

SEGREST, J.P., JACKSON, R.L., ANDREWS, E.P. & MARCHESI, V.T. Human erythrocyte membrane glycoprotein - re-evaluation of molecular weight as determined by sds polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 44**,** 390-&.1971.

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

SHI, Y., JI, M.-K., XU, J.-W., LIN, X. & LIN, J.-Y. High-Level Expression, Purification, Characterization and Structural Prediction of a Snake Venom Metalloproteinase Inhibitor in Pichia pastoris. *Protein Journal,* 31**,** 212-221. 2012.

SIIGUR, J., SAMEL, M., TONISMAGI, K., SUBBI, J., SIIGUR, E. & TU, A.T. Biochemical characterization of lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from Vipera lebetina snake venom. *Thrombosis Research,* 90**,** 39-49. 1998.

SINAN. Portal da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/. Acessado o dia 21 de abril de 2014.

SOARES, A.M., TICLI, F.K., MARCUSSI, S., LOURENCO, M.V., JANUARIO, A.H., SAMPAIO, S.V., GIGLIO, J.R., LOMONTE, B. & PEREIRA, P.S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. *Current Medicinal Chemistry,* 12**,** 2625-2641. 2005.

STRAIGHT, R., GLENN, J.L. & SNYDER, C.C. Antivenom activity of rattlesnake blood-plasma. *Nature,* 261**,** 259-260. 1976.

STRAUCH, M.A., TOMAZ, M.A., MONTEIRO-MACHADO, M., RICARDO, H.D., CONS, B.L., FERNANDES, F.F.A., EL-KIK, C.Z., AZEVEDO, M.S. & MELO, P.A. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant Humirianthera ampla and constituents. *Journal of Ethnopharmacology,* 145**,** 50-58. 2013.

TAKEDA, S., TAKEYA, H. & IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics,* 1824**,** 164-176. 2012.

TALLANT, C., GARCIA-CASTELLANOS, R., BAUMANN, U. & XAVIER GOMIS-RUETH, F. On the Relevance of the Met-turn Methionine in Metzincins. *Journal of Biological Chemistry,* 285**,** 13951-13957. 2010.

TANIZAKI, M.M., KAWASAKI, H., SUZUKI, K. & MANDELBAUM, F.R. Purification of a proteinase-inhibitor from the plasma of bothrops-jararaca (jararaca). *Toxicon,* 29**,** 673-681. 1991.

THWIN, M.M. & GOPALAKRISHNAKONE, P. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: A mini review of the recent developments (1991-1997). *Toxicon,* 36**,** 1471-1482. 1998.

TOKARNIA, C.H. & PEIXOTO, P.V. The importance of snake bites as cause of cattle death in Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira,* 26**,** 55-68. 2006.

UETZ, P. The Reptile Database, Species Numbers (as of Feb 2014). http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html. Acessado o 21 de Abril de 2014.

VALENTE, R.H., DRAGULEV, B., PERALES, J., FOX, J.W. & DOMONT, G.B. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor - Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *European Journal of Biochemistry,* 268**,** 3042-3052. 2001.

VANPHILPOT, B., EZEKIEL, E., LASETER, Y., YAEGER, R.G. & STJERNHOLM, R.L. Neutralization of crotalid venoms by fractions from snake sera. *Toxicon,* 16**,** 603-609. 1978.

VASQUEZ, J., JIMENEZ, S.L., GOMEZ, I.C., REY, J.P., HENAO, A.M., MARIN, D.M., ROMERO, J.O. & ALARCON, J.C. Snakebites and ethnobotany in the Eastern region of Antioquia, Colombia-The traditional use of plants. *Journal of Ethnopharmacology,* 146**,** 449-455. 2013.

VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. *Biochimica Et Biophysica Acta,* 257**,** 11-&.1972.

VILCA-QUISPE, A., PONCE-SOTO, L.A., WINCK, F.V. & MARANGONI, S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake Bothrops marajoensis. *Toxicon,* 55**,** 745-753. 2010.

VONK, F.J., ADMIRAAL, J.F., JACKSON, K., RESHEF, R., DE BAKKER, M.A.G., VANDERSCHOOT, K., VAN DEN BERGE, I., VAN ATTEN, M., BURGERHOUT, E., BECK, A., MIRTSCHIN, P.J., KOCHVA, E., WITTE, F., FRY, B.G., WOODS, A.E. & RICHARDSON, M.K. Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature,* 454**,** 630-633. 2008.

VOSS, R.S. & JANSA, S.A. Snake-venom resistance as a mammalian trophic adaptation: lessons from didelphid marsupials. *Biological Reviews,* 87**,** 822-837. 2012.

WARRELL, D.A., GUTIÂERREZ, J.M. & ORGANIZATION, W.H. *Rabies and Envenomings: A Neglected Public Health Issue : Report of a Consultative Meeting, World Health Organization, Geneva, 10 January 2007*: WHO Regional Office for the Western Pacific. 2007.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. Geneva. 2010.

YAMAKAWA, Y. & OMORISATOH, T. Primary structure of the antihemorrhagic factor in serum of the japanese habu - a snake-venom metalloproteinase inhibitor with a double-headed cystatin domain. *Journal of Biochemistry,* 112**,** 583-589. 1992.

YONG, V.W., KREKOSKI, C.A., FORSYTH, P.A., BELL, R. & EDWARDS, D.R. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends in Neurosciences,* 21**,** 75-80. 1998.

ANEXO

8. ANEXO

Anexo 1. Certificado Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
***Campus* de Ribeirão Preto**
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 12.1.231.53.7), intitulado "Isolamento e *caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de metaloprotease presente no* soro da serpente *Bothrops alternatus*", de autoria de **Tatiana Zapata Palacio e Suely Vilela,** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 31/03/2014.
Colaboradores:

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.231.53.7), entitled: "*Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de metaloprotease* presente no soro da serpente *Bothrops alternatus*", by **Tatiana Zapata Palacio and Suely Vilela** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, March, 31 2014.

Ribeirão Preto, 04 de Abril de 2014.

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan
Presidente da CEUA

João Diniz
João Fernando Velho de Andrade Diniz
Auxiliar da Secretaria da CEUA

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 3526 – Fax: (16) 3602 3526