

AUGUSTO VILCA QUISPE

**“Estudos comparativos da atividade cinética e trombina-símile de
serinoproteases isoladas a partir dos venenos de *Bothrops brazili* e
Bothrops roedingeri”**

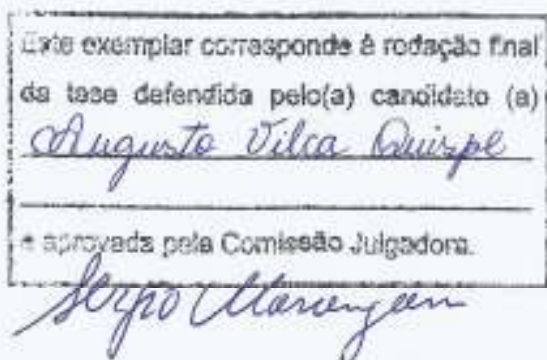
**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Augusto Vilca Quispe

**“Estudos comparativos da atividade cinética e trombina-símile de
serinoproteases isoladas a partir dos venenos de *Bothrops brazili* e
Bothrops roedingeri”**



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Marangoni
Coorientador: Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

V711e Vilca Quispe, Augusto, 1970-
Estudos comparativos da atividade cinética e
trombina-símile de serinoproteases isoladas a partir dos
venenos de Bothrops brazili e Bothrops roedingeri /
Augusto Vilca Quispe. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Sergio Marangoni.
Coorientador: Luis Alberto Ponce Soto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Serinoprotease. 2. Bothrops roedingeri. 3.
Bothrops brazili. 4. Cromatografia líquida de alta
eficiência. 5. Enzima trombina "like". 6. Veneno –
Purificação. I. Marangoni, Sergio, 1951-. II. Ponce-
Soto, Luis Alberto. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Comparative studies of the kinetics and thrombin-like activity of
serine proteases isolated from the venom of Bothrops brazili and Bothrops roedingeri

Palavras-chave em Inglês:

Serine proteases
Bothrops roedingeri
Bothrops brazili
HPLC (Chromatography)
Thrombin-like enzyme
Venom – Purification

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Sergio Marangoni [Orientador]
José Camillo Novello
Thalita Rocha
Ana Carolina Santos de Souza Galvão
Walter Luís Garrido Cavalcante

Data da defesa: 19-03-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 19 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sergio Marangoni (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Jose Camilo Novello


Assinatura

Dra. Gláucia Coelho de Mello

Assinatura

Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão


Assinatura

Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante


Assinatura

Profa. Dra. Thalita Rocha


Assinatura

Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni

Assinatura

Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi

Assinatura

Dedicatória

A minha família...

Não há palavras que possam descrever meu profundo agradecimento à minha querida Mãe Benita, quem merece mais do que eu este título que agora obtenho, por seu esforço, apoio incondicional e dedicação incansável em auxiliar na minha formação profissional e em me ensinar bons valores. Agradeço também a meu Pai Dionicio, que não pode ver este resultado, pois partiu cedo desta vida. A meus queridos irmãos: Fernando, Martha, Isabel e Julia, que durante todos estes anos confiaram em mim, compreenderam meus ideais e minha ausência. Amo vocês todos.

Agradecimentos

Meus agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Marangoni, pela oportunidade, confiança, pelo incentivo e pela orientação durante a realização deste trabalho em seu laboratório. Agradeço muito por ter me aceitado e acolhido como seu aluno, pois com ele tive a oportunidade de enriquecer meu conhecimento com as idéias científicas e sugestões no projeto.

Ao meu amigo e co-orientador Luis Alberto, pela amizade, confiança, sugestões e discussões do trabalho. Muito obrigado!

Ao Paulo Baldasso, o nosso querido Paulinho, pela amizade e apoio técnico no laboratório durante todo o projeto.

Aos professores da banca e pré-banca: Prof. Dr. Marcelo Lancellotti, Prof. Dr. José Camillo Novello, Profa. Dra. Gláucia Coelho de Mello, Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão, Prof. Dr. Walter Luís Garrido Cavalcante, Profa. Dra. Thalita Rocha, Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni e Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi, por terem aceitado o convite para participar da minha banca examinadora e por contribuírem com a melhora deste trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), pela colaboração com as análises de espectrometria de massas.

A todos meus amigos e colegas do Laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP) pela gentileza, amabilidade, ajuda, sugestões com o trabalho e pela alegre convivência que tive com todos eles. Muito obrigado!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de estudo de Doutorado que possibilitou a produção desta tese.

Por último, gostaria de agradecer à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em especial ao Instituto de Biologia (IB), por essa tão grande oportunidade.

Índice

Lista de Abreviações	viii
Resumo	x
Abstract	xi
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Proteases presentes no veneno de serpentes	1
1.2. Serinoproteases do veneno de serpentes	2
1.3. Caracterização cinética de serinoproteases	8
1.3.1. Constante de Michaelis (K_M)	9
1.3.2 Constante catalítica (k_{cat})	9
1.3.3 Constante de especificidade (k_{cat}/K_M)	9
1.4. Hemostasia, coagulação sanguínea e fibrinólise	11
1.5. Alterações teciduais causadas por proteases botrópicas	14
1.6. Importância das serinoproteases provenientes de veneno de serpentes na clínica	16
1.7. Aspectos estruturais e funcionais de serinoproteases de veneno de serpentes	18
1.8. <i>Bothrops brazili</i>	19
1.9. <i>Bothrops roedingeri</i>	20
II. OBJETIVOS	21
III. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Venenos	23
3.2. Animais	23
3.3. Reagentes	23
3.4. Purificação	23
3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência–fase reversa (HPLC-FR)	23
3.5. Caracterizações Físico-químicas	24
3.5.1 Atividade proteolítica sobre o BApNA	24
3.5.2 Determinação das massas moleculares das frações TLBbz e TLBro por Eletroforese em SDS-PAGE	25
3.5.3 Análise e estudo da homologia sequencial da TLBbz e TLBro	26
3.5.3.1 Redução e alquilação.	26
3.5.3.2 Hidrólise enzimática.	26
3.5.3.3 Sequencia de aminoácidos deduzidas por espectrometria de massa dos peptídeos tripticos	26
3.5.4 Analise de composição de aminoácidos	27
3.5.5 Estudos cinéticos da enzima TLBbz e TLBro	29
3.5.5.1. Efeito da concentração do substrato	29
3.5.5.2. Efeito da temperatura	30
3.5.5.3. Efeito do pH	30
3.5.5.4 Inibição da atividade serinoprotease por PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto) e outros inibidores	30
3.5.5.5 Efeito dos íons divalentes sobre a atividade enzimática.	31
3.6 Caracterizações Farmacológicas	32
3.6.1 Atividade coagulante	32
3.6.2. Atividade fibrinogenolítica	32

3.6.2.1 Efeito da concentração de enzima na degradação do fibrinogênio	32
3.6.2.2 Efeito do tempo na degradação do fibrinogênio	33
3.6.2.3 Efeito do pH na degradação do fibrinogênio	33
3.6.2.4 Efeito da temperatura na degradação do fibrinogênio	34
3.6.2.5 Efeito dos íons na degradação do fibrinogênio	34
3.6.3 Determinação da Agregação plaquetária	35
3.7. Análise Estatística	36
IV. RESULTADOS	37
4.1. Purificação de uma fração com atividade trombina-símile isolada a partir de veneno total de <i>Bothrops brazili</i> e <i>B. roedingeri</i> em HPLC de fase reversa	37
4.2. Atividade proteolítica da trombina-símile TLBbz e TLBro	39
4.3. Determinação da massa molecular das frações TLBbz e TLBro por SDS-PAGE	41
4.4 Determinação das sequências de peptídeos da fração TLBbz purificada de <i>Bothrops brazili</i>	42
4.5 Determinação do peptídeo crucial por espectrometria de massa (MS/MS)	43
4.6 Análise da homologia sequencial da trombina-símile TLBbz	44
4.7 Determinação das sequências de peptídeos da fração TLBro purificada de <i>Bothrops roedingeri</i> .	45
4.8 Determinação do peptídeo crucial por espectrometria de massa (MS/MS)	46
4.9 Estudos das atividades cinéticas das Trombinas-símile TLBbz e TLBro.	48
4.9.1 Efeito da concentração do substrato	48
4.9.2 Efeito da temperatura	50
4.9.3 Efeito do pH na atividade proteolítica da trombina-símile TLBbz e TLBro	51
4.9.4 Efeito inibitório da atividade proteolítica	52
4.9.5 Efeito dos íons sobre a atividade proteolítica	53
4.10 Análise de Composição de Aminoácidos (Pico-Tag) Waters.	54
4.11 Caracterização farmacológica da serinoprotease com atividade trombina-símile TLBbz e TLBro procedentes de <i>B. brazili</i> e <i>B. roedingeri</i> .	55
4.11.1 Avaliação da atividade coagulante da trombina-símile TLBbz e TLBro	55
4.11.2 Degradação do fibrinogênio pela ação da trombina-símile TLBbz e TLBro e sua análise via SDS-PAGE	56
4.11.2.1 Efeito da concentração de enzima na degradação do fibrinogênio	56
4.11.2.2 Efeito do tempo na degradação do fibrinogênio	57
4.11.2.3 Efeito do pH na degradação do fibrinogênio	58
4.11.2.4 Efeito da temperatura na degradação do fibrinogênio	59
4.11.2.5 Efeito dos íons na degradação do fibrinogênio	60
4.11.3 Determinação da Agregação Plaquetária	61
V. DISCUSSÃO	62
VI. CONCLUSÕES	73
VII. BIBLIOGRAFIA	74
VIII. ANEXO	84

Lista de Abreviações

μ-Bondapak C18	Coluna de HPLC com n-octadecil como base da fase estacionária
ADP	Adenosina-difosfato
AT	Antitrombina
DCVs	Doenças cardiovasculares
DL-BAPNA	Nα-Benzoil-DL-Arginil ρ-Nitroanilida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DFP	Diisopropilfluorofosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido glicol-bis (2 aminoetileter) –N,N,N,N-tetracético
ESI-QTOF-MS/MS	Ionização por Electrospray – quadrupolos por tempo de vô - espectrometria de massas/ espectrometria de massas
FP-A	Fibrinopeptídios A
FP-B	Fibrinopeptídios B
FP-AB	Fibrinopeptídios AB
FB	Fibrinogênio bovino
HMWK	Cininogênio de alto peso molecular
HPLC-RP	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Fase Reversa
GPIb	Glicoproteína Ib
kDa	kiloDalton
K_M	Constante de Michaelis-Menten
MS/ESI	Espectrometria de massa/Ionização por electrospray
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAR1	Receptor ativador de protease 1
PAR4	Receptor ativador de protease 4
pH	Potencial hidrogeniônico
PITC	Fenilisotiocianato
PMID	Identificador PudMed
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto, Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
<i>p</i> -NA	<i>p</i> -nitroanilina
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PSA	Persulfato de amônio
PTN C	proteína C
PTN S	proteína S
SBT1	Inibidor de tripsina de soja
RT-PCR	Transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio
SVTLEs	Enzima trombina símile de veneno de serpente
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenodiamino
TFA	Ácido Trifluoracético
TLBbz	Trombina-símile <i>Bothrops brazili</i>
TLBro	Trombina-símile <i>Bothrops roedingeri</i>

TLE	Enzima trombina-símile
tPA	Ativador de plasminogênio tecidual
TR	Trombina
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometane Hidrochloride
V_{max}	Velocidade máxima

Resumo

No presente trabalho duas novas serinoproteases com atividade trombina-símile, nomeadas TLBbz e TLBro isoladas a partir de *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri* respectivamente, foram purificadas em um único passo cromatográfico por HPLC de fase reversa com um alto grau de pureza e homogeneidade molecular, sem perda da atividade biológica. Ambas serinoproteases foram caracterizadas físico-quimicamente, revelando uma massa molecular relativa de TLBbz = 35,13 KDa e TLBro = 20,24 KDa por SDS-PAGE. Ambas apresentaram atividade proteolítica perante o substrato cromogênico DL-BapNA. Os estudos da atividade cinética mostraram que as serinoproteases tiveram um comportamento michaeliano frente ao substrato DL-BapNA, apresentando uma $V_{max} = 1,89$ nmoles p-NA/Lt/min e $K_M = 0,853$ mM para TLBbz; e $V_{max} = 0,0432$ nmoles p-NA/Lt/min e $K_M = 0,039$ mM para TLBro. Ambas serinoproteases apresentam uma atividade ótima em torno de 38 °C e pH 8,0; sendo inibidas pela ação do fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e outros inibidores, através dos quais a atividade trombina-símile foi reduzida em mais do 50 % (TLBbz = 86.2 % and TLBro = 42.6 %). Ambas TLBbz e TLBro possuem caráter ácido ao apresentar um elevado número de aminoácidos ácidos, assim como uma boa quantidade em número de aminoácidos hidrofóbicos, o que garante a estabilidade conformacional da proteína. A presença de 12 cisteínas sugere a possível formação de 6 pontes dissulfeto. TLBbz e TLBro evidenciaram uma atividade fibrinogenolítica frente ao fibrinogênio bovino hidrolisando a cadeia alfa (α) e beta (β), comportando-se como uma trombina-símile tipo AB no caso da TLBro e tipo B, por hidrolizar a cadeia beta (β), no caso da TLBbz. Finalmente, estudos da atividade biológica indicam a propriedade de induzir agregação plaquetária e esse efeito é inibido pela presença de PMSF.

Abstract

In this work, two new serine proteases with thrombin-like activity called TLBbz and TLBro from *Bothrops brazili* and *Bothrops roedingeri* respectively, were purified in a single chromatographic step by reverse phase HPLC with a high degree of purity and molecular homogeneity without loss of biological activity. Both serine proteases have been characterized physico-chemically, showing a relative molecular mass of TLBbz = 35.13 and TLBro = 20.24 kDa by SDS-PAGE. On the other hand, showed a proteolytic activity towards the chromogenic substrate DL-BapNA. The studies of the kinetic activity showed that serine proteases have a michaelian behavior when tested with the substrate DL-BapNA, with a $V_{\max} = 1.89$ nmoles p-NA/Lt/min and $K_M = 0.853$ mM for TLBbz, and $V_{\max} = 0.0432$ nmoles p-NA/Lt/min and $K_M = 0.039$ mM for TLBro. Both serine proteases have an optimal activity around 38 °C and pH 8,0; and were inhibited by the action of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and other inhibitors, whereby the thrombin-like activity was reduced in more than 50 % (TLBbz = 86.2 % and TLBro = 42.6 %). Both TLBbz and TLBro have acidic character by presenting a large number of aminoacids acids and a good amount of hydrophobic amino acids, which ensures the conformational stability of the protein. The presence of 12 cysteines suggests the possible formation of six disulfide bridges. TLBbz and TLBro showed an fibrinogenolytic activity against the bovine fibrinogen and hidrolise alpha (α) and beta (β) chain, behaving as a thrombin-like AB types in the case of TLBro and hydrolyzing the beta chain (β) behaving as a thrombin-like B types in the case of TLBbz. Finally, studies of biological activity indicate the ability to induce platelet aggregation and this effect is inhibited by the presence of PMSF.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Proteases presentes no veneno de serpentes

Existem no mundo aproximadamente 3000 espécies de serpentes, sendo que 10 a 14 % são consideradas venenosas (Cardoso e Brando, 1982) e classificadas em diversas famílias: Elapidae, Crotalidae, Hydrophidae e Colubridae (Lu *et al.*, 2005).

Os acidentes ofídicos e suas consequências locais, sistêmicas e até fatais têm sido observadas desde o tempo das antigas civilizações (Ângulo e Lomonte, 2009). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 2.500.000 acidentes ocorrem anualmente, resultando em uma média de 125 mil mortes por ano (Pinho *et al.*, 2004 e 2005; Sitprija, 2006; Bawaskar, 2004). Ocorrem aproximadamente 21 mil acidentes ofídicos registrados no Brasil, levando ao óbito cerca de 120 vítimas por ano (Cruz *et al.*, 2009; Kasturiratne *et al.*, 2008), constituindo, portanto, um grave problema de Saúde Pública (Ministério da Saúde, 2001; Warrell, 2010; Williams, 2010).

O Peru é outro país da América Latina que também é afetado por envenenamentos ofídicos (Zavaleta e Salas, 1996) por possuir uma diversa herpetofauna que inclui espécies da família Elapidae (gênero *Micrurus*) e Viperidae (gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) sendo que a maior taxa de letalidade ocorre na Amazônia. As zonas rurais da costa norte deste país também têm frequentes envenenamentos (Campbell e Lamar, 2004).

Os venenos das serpentes das famílias Viperidae e Elapidae são as principais responsáveis pelos danos teciduais locais (Warrell, 1995 e 2004), envolvendo complexos efeitos patológicos como: necrose, hemorragia, edema, alterações nos vasos linfáticos e degradação da matriz extracelular (Gutiérrez e Lomonte, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2009).

A literatura apresenta o isolamento e a caracterização de inúmeras proteínas ofídicas, que exibem diversas atividades biológicas e/ou enzimáticas, tais como: proteases, miotoxinas, fosfolipases A₂, fosfomonoesterases, L-aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, nucleotidases, desintegrinas e lectinas tipo C, além de peptídeos bioativos (Matsui *et al.*, 2000; Swenson e Markland Jr, 2005; Perales *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Calvete *et al.*, 2005; Matsui *et al.*, 2010).

As enzimas proteolíticas, classificadas principalmente como metalo- e serinoproteases, geralmente afetam o sistema hemostático (Garcia *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2005), frequentemente levando à hemorragia após inoculação na vítima (Marsh *et al.*, 1994; Kamiguti *et al.*, 1996; Marsh *et al.*, 2005) podendo ser classificadas como procoagulantes, anticoagulantes e/ou fibrin(ogen)olíticas (Markland Jr, 1991; Siigur e Siigur, 1992; Clemetson *et al.* 2005).

As metaloproteases ou hemorraginas, encontradas nos venenos de serpentes são dependentes de cátions (normalmente Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mg^{2+}). Elas são sintetizadas na glândula de veneno como proteínas multidomínios que compreendem um domínio proenzima e um domínio protease. Essas metaloproteases são secretadas como pre-proenzimas e ainda possuem módulos regulatórios adicionais, os quais são responsáveis pelas interações com a matriz extracelular e integrinas (Ramos *et al.*, 2003).

1.2 As serinoproteases do veneno de serpentes

São conhecidas por causarem desordens hemostáticas, interferindo em pontos distintos da coagulação sanguínea por degradação proteolítica ou seletivamente, por ativação ou inibição específica de fatores coagulantes envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (Braud *et al.*, 2000), causando, paradoxalmente, coagulação sanguínea *in vitro* (Pirkle, 1998; Magalhães *et al.*, 2007) e incoagulabilidade *in vivo* por diminuir o fibrinogênio circulante, competindo com a trombina (TR) pela hidrólise do fibrinogênio. No entanto, ao contrário da ação da TR, as enzimas trombina-símile (TLEs) não são inibidas pela heparina e, geralmente, não ativam o fator XIII da cascata de coagulação (Figura 1). A atividade de serinoproteases está relacionada principalmente à ação do tipo trombina (trombina-símile) de venenos botrópicos (Matsui *et al.*, 2000; Santoro e Sano-Martins, 2003). Estas serinoproteases possuem resíduos de aminoácidos em posições específicas correspondendo a uma tríade catalítica altamente conservada (Ser₁₉₅, His₅₇ e Asp₁₀₂) em posições análogas em relação às serinoproteases de mamíferos, conforme a numeração do quimotripsinogênio (Perona e Craik, 1997; Matsui *et al.*, 2000; Serrano e Maroun, 2005), e podem ativar ou inativar fatores de coagulação sanguínea, interferir na agregação plaquetária e participar do sistema fibrinolítico (Braud *et al.*, 2000; White, 2005). As diferenças e similaridades entre a trombina e as enzimas trombina-símile de veneno de serpentes podem ser observadas no quadro 1.

As serinoproteases de veneno de serpentes pertencem a uma grande família de peptidases conhecida como Tripsina S1 do clã SA, pois possuem estrutura semelhante à tripsina; e apesar desta similaridade estrutural, elas frequentemente atuam em substratos macromoleculares específicos (Halfon e Craik, 1998).

Apresentam entre si, com apenas uma exceção descrita (Wang *et al.*, 2001), 12 resíduos de cisteína nas mesmas posições, que perfazem 6 pontes dissulfeto (provavelmente 22-157, 42-58, 91-250, 136-201, 168-182 e 191-220), uma vez que não há grupos tiois livres (Serrano e Maroun, 2005; Amiconi *et al.*, 2000; Nikai *et al.*, 1995; Parry *et al.*, 1998). As pontes dissulfeto

mostraram-se essenciais para a atividade catalítica destas enzimas, uma vez que o tratamento com agentes redutores como β -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT) as inativam, como descrito para flavoridiobina, originada de *Trimeresurus flavoviridis* (Pirkle *et al.*, 1998; Tatematsu *et al.*, 2000).

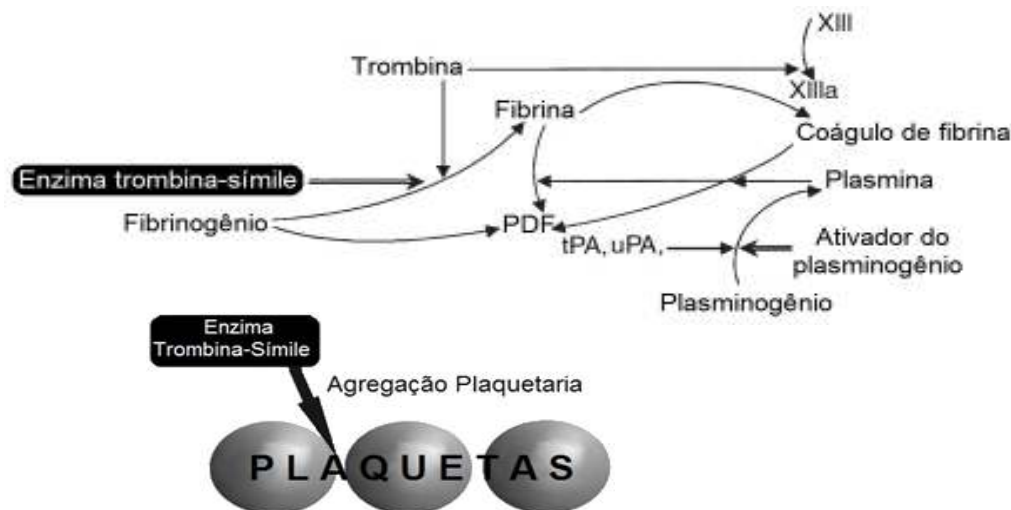


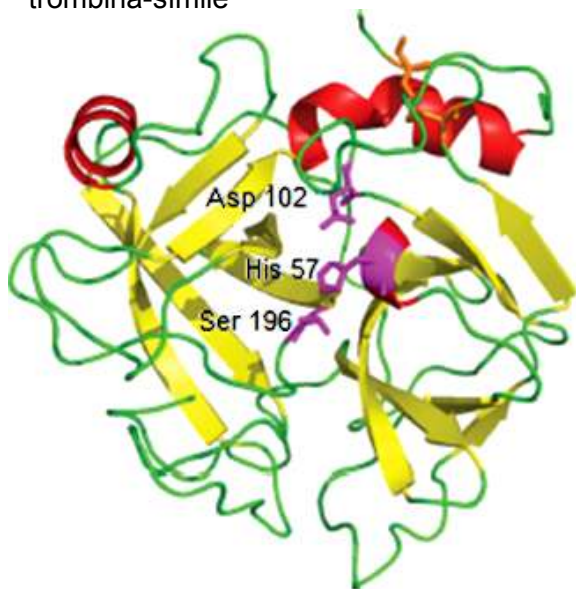
Figura 1. Sitios da interação da trombina-símile na via da cascata de coagulação dentro da hemostase humana (Ilustração modificada: White, 2005).

São compostas por uma única cadeia polipeptídica ou, mais raramente, duas como a brevinase de *Agkistrodon blomhoffii brevicaudatus* (Lee *et al.*, 1999). A maior parte apresenta glicosilações em resíduos de asparagina, mas não em posições conservadas. O conteúdo de carboidratos ligados varia amplamente (0 a 30% do peso), tendo participação, às vezes, no reconhecimento de substratos pela enzima e, especialmente, na estabilização da estrutura terciária destas enzimas (Castro *et al.*, 2004).

Geralmente, as serinoproteases de veneno de serpentes se enovelam de forma semelhante à quimotripsina, enzima digestiva que apresenta dois domínios assimétricos de folhas beta, separados pela tríade catalítica. O mecanismo catalítico destas proteases inclui a reatividade do resíduo serina, responsável pela formação de um complexo transiente acil-enzima, o qual é estabilizado por resíduos de histidina e ácido aspártico no interior do sítio ativo (Lesk e Fordham, 1996) (Figura 2). O resíduo de serina reage com inibidores enzimáticos clássicos de serinoproteases como o PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto), o DFP (diisopropilfluorofosfato) e a benzamidina, formando um complexo inativo estável o que confirma a função de serinoprotease destas enzimas.

Embora a região central próxima à tríade catalítica das serinoproteases de veneno de serpentes, seja bastante conservada, estas enzimas apresentam consideráveis diferenças estruturais de uma para outra (bem como em relação à trombina), o que elucida as diferentes especificidades e atividades em relação aos diferentes inibidores e substratos em que atuam (Serrano e Maroun, 2005; Krem e Di Cera, 2001). A discussão deste assunto é facilitada pelo uso da nomenclatura sugerida por Schechter e Berger (1967). Nesta nomenclatura os aminoácidos na porção N-terminal da ligação peptídica clivada pela protease são enumerados de acordo com sua posição na cadeia partindo da ligação (P1, P2, P3 e assim por diante). Os aminoácidos da porção C-terminal são enumerados como P1', P2', P3', etc. Já os sítios da enzima (um ou mais aminoácidos) que interagem com os substratos são enumerados como S1 ou S1' de acordo com o aminoácido do substrato com o qual interage. Portanto, o aminoácido em P1 interage principalmente com S1 (subsítio 1) na enzima, o aminoácido em P2 interage com S2 e assim por diante.

(A) serino protease
trombina-símile



(B) quimotripsina

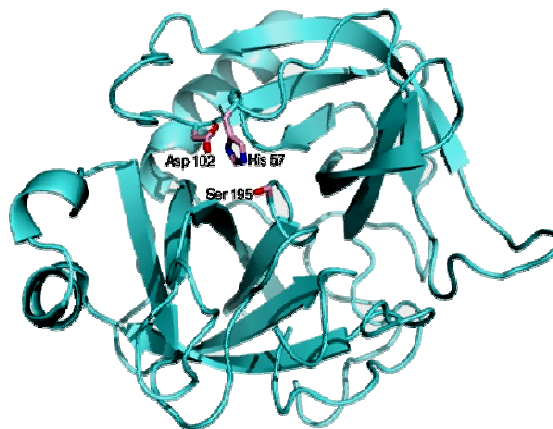


Figura 2. (A) Estrutura da saxthrombin (serinoprotease trombina-símile isolada de *Gloydius saxatilis*), destacando a posição dos resíduos de aminoácidos que fazem parte da tríada catalítica. Adaptado de Huang *et al.*, 2011. Os elementos estruturais secundários indicados acima das sequências estão de acordo com a convenção utilizada para a quimotripsina (B). As tríades catalíticas, His₅₇, Asp₁₀₂ e o resíduo reativo Ser₁₉₅ respectivamente, são mostrados (Ilustração modificada: Ma *et al.*, 2005).

Já foi reconhecida a presença de um sítio de ligação de sódio na molécula de trombina (Di Cera *et al.*, 1995; De Filipis *et al.*, 2005). Foi demonstrado que o sódio tem a propriedade de regular alostericamente a atividade da trombina. A atividade da trombina sobre fatores procoagulantes, tais como receptor ativador de protease 1 (PAR1) e fibrinogênio, é dependente de sódio, mas não é sobre fatores anticoagulantes (proteína C). Deste modo, a disponibilidade de sódio no meio sugere a especificidade de ação da molécula de trombina (Dang *et al.*, 1995).

Estudos têm demonstrado que as serinoproteases de veneno de serpentes não são reguladas alostericamente por íons sódio (Castro *et al.*, 2001), devido a ausência deste sítio de ligação de sódio. Diferentemente da trombina que apresenta Tyr₂₂₅, as serinoproteases de veneno de serpentes exibem uma Pro₂₂₅. A tirosina na posição 225 é essencial para a estruturação do sítio de ligação do sódio na trombina e, conseqüentemente importante na regulação de sua atividade por estes íons (Castro *et al.*, 2004; Guinto *et al.*, 1999).

Sabe-se também que a trombina apresenta sobre sua superfície duas regiões carregadas positivamente (subsítios secundários I e II) e uma região de natureza hidrófoba que são importantes na ligação da trombina com seus substratos e inibidores (Castro *et al.*, 2004). A maioria das serinoproteases de venenos de serpentes apresenta uma região hidrófoba semelhante à trombina, mas não apresenta os sítios carregados positivamente.

O subsítio secundário I é essencial para a interação da trombina (e subsequente catálise) através de atração eletrostática com seus substratos naturais. Fibrinogênio, receptores de plaquetas (PAR-1 e PAR-3, glicoproteína Ib plaquetária – GPIb), porção C-terminal da hirudina (inibidor natural de trombina derivado de sanguessugas) e trombomodulina interagem com trombina através desta região. O subsítio secundário II é responsável pela interação da heparina com a trombina.

Outra implicação destas diferenças estruturais entre trombina e serinoproteases de veneno de serpentes é o desempenho frente ao fibrinogênio. A trombina cliva o fibrinogênio em duas ligações Arg-Gly, na cadeia A α (liberando FP-A) e na cadeia B β (liberando FP-B). Algumas serinoproteases de veneno de serpentes clivam o fibrinogênio em ambas as cadeias, mas a maioria delas cliva o fibrinogênio em apenas uma cadeia (A α ou B β). A especificidade de clivagem dirigida somente à cadeia γ do fibrinogênio não foi descrita na literatura até o presente momento. De acordo com Markland Jr (1991), as enzimas fibrinogenolíticas podem ser classificadas de acordo com sua atividade sobre fibrinogênio: serinoproteases de veneno de serpentes FP-A ou venombin A (clivam preferencialmente a cadeia A α liberando FP-A), serinoproteases de veneno de serpentes FP-B ou venombin B (clivam preferencialmente a cadeia

B β liberando FP-B) e serinoproteases de veneno de serpentes FP-AB ou venombin AB (clivam as duas cadeias A e B liberando FP-A e FP-B) (Kornalik, 1990; Markland, 1997; Magalhães *et al.*, 2007). A clivagem do fibrinogênio em apenas uma cadeia leva à formação de monômeros de fibrina anormais, que se polimerizam, porém em uma frágil rede que não é reconhecida pelo fator XIII (responsável pelo fortalecimento da rede de fibrina) e, conseqüentemente, é facilmente disperso pela corrente sanguínea e são facilmente susceptíveis à plasmina. Isto leva a um quadro de hipofibrinogenemia e hipocoagulabilidade, ação contrária, portanto, à da trombina sobre a coagulação (Castro *et al.*, 2004).

Há também enzimas trombina-símile conhecidas como ancrode ('ancrod'), isolada do veneno de *Agkistrodon rhodostoma* (Burkhart *et al.*, 1992), batroxobina, isolada de *Bothrops atrox* (Stocker e Barlow, 1976) e crotalase, isolada de *Crotalus adamanteus* (Markland e Damus, 1971). Essas enzimas liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A (FP-A) e, portanto, pertencem à classe venombin A, não ativam o fator XIII ou outros fatores de coagulação e não causam agregação plaquetária, de forma que o coágulo formado não possui ligações covalentes entre as cadeias fibrínicas (Marsh, 1994). As enzimas trombina-símile que liberam os fibrinopeptídeos A e B e ativam o fator XIII são conhecidas como venombinas AB e possuem como exemplo a enzima isolada do veneno de *Bitis gabonica* (Pirkle, 1998). Enzimas como a contortrixobina, isolada de *Agkistrodon contortrix contortrix* (Amiconi *et al.*, 2000) e okinaxobina I, isolada de *Trimeresurus okinavensis* (Iwasaki *et al.*, 1990) representam uma terceira classe de venombinas, conhecidas como venombinas B, que liberam preferencialmente o FP-B.

Algumas enzimas trombina-símile de veneno de serpentes induzem agregação plaquetária pela proteólise de receptores plaquetários (PAR1 e PAR4), porém com atividade bem menor do que a trombina (Castro *et al.*, 2004). Esta propriedade pode levar ao uso destas enzimas para estudos sobre plaquetas.

Enzimas trombina-símile de veneno de serpentes geralmente atuam apenas sobre o fibrinogênio, ou seja, não atuam sobre outros fatores da coagulação. Entretanto existem algumas exceções. Uma serinoprotease que ativa o Fator V foi descrita em *Agkistrodon contortrix contortrix* (contortrixobina) (Amiconi *et al.*, 2000), com atividade 250 a 500 vezes menor que a trombina (Rosing *et al.*, 2001). Em *Bothrops jararaca* e *Bothrops atrox* (botrombina e trombocitina, respectivamente) foram descritas enzimas trombina-símile de veneno de serpentes que ativam fator VIII (Niewiarowski *et al.*, 1979; Nishida *et al.*, 1994). Foi descrita para cerastocitina de *Cerastes cerastes* (Marrakchi *et al.*, 1995) a propriedade de ativar o fator X.

O resíduo de aspartato (Asp₁₈₉), localizado na base do sítio ativo das enzimas trombina-símile de veneno de serpentes, requer aminoácidos básicos como a arginina e lisina no substrato, o que justifica a especificidade enzimática em catalisar a quebra de ligações arginil. Substratos fluorogênicos ou cromogênicos para enzimas fibrinogenolíticas também podem ser utilizados para a determinação de atividades amidolíticas ou esterolíticas de enzimas trombina-símile de veneno de serpentes (Silva Júnior e De-Simone, 2004). As atividades específicas de determinadas enzimas de veneno de serpentes merecem cautela, pois algumas ações podem ser desencadeadas sinergisticamente por duas ou mais toxinas (Ângulo e Lomonte, 2009). Além disso, uma única enzima pode ter mais de uma atividade específica e, conseqüentemente, ser responsável por múltiplos efeitos decorrentes do envenenamento. De qualquer forma, o isolamento e a caracterização de componentes presentes em venenos representam passos fundamentais para o entendimento dos eventos envolvidos em acidentes ofídicos (Ângulo e Lomonte, 2009).

Quadro 1: Resumo descritivo de diferenças e similaridades entre a trombina e as enzimas trombina-símile de veneno de serpentes.

TROMBINA	ENZIMA TROMBINA-SÍMILE
➤ Pertencem à família das tripsinas.	➤ Pertencem à família das tripsinas.
➤ Induzem agregação plaquetária.	➤ Podem ou não induzir agregação plaquetária.
➤ Atuam sobre outros fatores da coagulação.	➤ Podem ou não atuar em outros fatores da coagulação.
➤ Hidrolisa simultaneamente cadeias α e β .	➤ Hidrolisa cadeias α , β ou ambas α e β simultaneamente.
➤ São inibidas pela heparina.	➤ Não são inibidas pela heparina.
➤ Ativam o fator XIII, responsável pela polimerização da rede de fibrina.	➤ Não ativam o fator XIII e conseqüentemente não fortalece a rede de fibrina.
➤ Tem sítios de ligação de Na ⁺ , portanto são regulados alostericamente por estes íons (Tyr ₂₂₅ funciona como sítio para a ligação desse íon).	➤ Não tem sítio de ligação de Na ⁺ e não são regulados alostericamente (apresentam Pro ₂₂₅ neste sítio, diferentemente da trombina).
➤ Apresenta duas regiões carregadas positivamente e uma região de natureza hidrofóbica, sítios importantes para a ligação com os substratos e inibidores.	➤ Apresenta uma região hidrofóbica semelhante à trombina, mas não apresenta os sítios carregados positivamente.
➤ Apresenta baixo grau de similaridade com as trombinsas-símile de veneno de serpentes (26 ~ 33 %) na sequência primária.	➤ Compartilham não só a tríade catalítica, mas também cinco pontes dissulfeto topologicamente equivalentes.

1.3 Caracterização cinética de serinoproteases

Para o estudo das características bioquímicas de proteases entre elas enzimas trombina-símile de veneno de serpentes, são exploradas diversas ferramentas experimentais. Para a caracterização cinética uma das ferramentas mais utilizadas é a obtenção de parâmetros cinético enzimáticos da enzima como o K_M e V_{max} para substratos cromogênicos sintéticos.

A utilização de substratos sintéticos é justificada tendo em vista a alta dificuldade de se obter os substratos naturais em quantidades apreciáveis e graus de pureza aceitáveis. Em um trabalho de Friberger (1982 e 1991) sobre o uso de substratos peptídicos cromogênicos, tais como os peptidil-pNA's, foi verificada a superioridade do uso destes substratos sobre os substratos naturais e substratos sintéticos (ésteres de lisina e arginina). Os substratos cromogênicos do tipo peptidil-pNA mimetizam sequências curtas de aminoácidos dos substratos naturais e permitem o acompanhamento da hidrólise destas ligações peptídicas por leitura espectrofotométrica, facilitando enormemente a obtenção dos parâmetros cinéticos das enzimas que clivam estas ligações.

Outra vantagem do uso destes substratos é o fato de que se podem sintetizar sequências específicas de aminoácidos (Figura 3), o que permite verificar a influência da sequência peptídica do substrato na atividade catalítica da enzima.

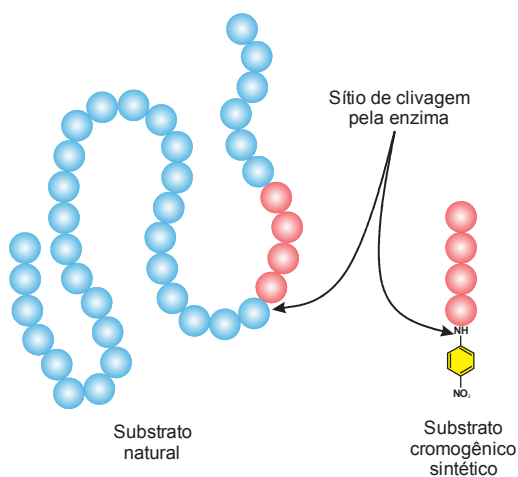


Figura 3. Mimetização de uma sequência de aminoácidos de um substrato natural por um substrato do tipo peptidil-pNA (4-Nitroanilida). O peptídeo derivado de pNA tem sido amplamente utilizado principalmente pela alta sensibilidade fotométrica na absorvância de 405 nm da p-nitroanilida liberada após hidrólise enzimática. (Ilustração modificada: Friberger e Gallimore, 1991).

Alguns parâmetros podem ser utilizados para avaliar os fatores que poderiam afetar a velocidade de reação como:

1.3.1 Constante de Michaelis (K_M) – o K_M é a concentração de substrato na qual uma determinada enzima trabalha com metade de sua velocidade máxima. No caso de hidrólise de amidas catalisadas por serinoproteases, como é o caso da atividade das enzimas trombina-símile de veneno de serpentes sobre os substratos do tipo peptidil-pNA, o valor de K_M é bastante próximo do valor da constante de ligação enzima-substrato, e o seu inverso ($1/K_M$). Este valor fornece uma idéia da afinidade que a enzima apresenta pelo respectivo substrato, o que depende da estrutura tridimensional e da natureza química dos substratos e do centro ativo da enzima trombina-símile de veneno de serpente. Portanto, quanto menor o valor de K_M , maior será a afinidade que a trombina-símile apresentará pelo substrato. Apenas o grau de afinidade ($1/K_M$) de uma enzima por um determinado substrato não reflete muito acerca da atividade enzimática, devido à existência de outros fatores que poderiam afetar a velocidade de reação como o pH, temperatura, íons e inibidores (Berg *et al.*, 2007; Nelson e Cox, 2011).

1.3.2 Constante catalítica (k_{cat}) – é a quantidade de ciclos catalíticos que cada unidade de enzima ativa processa por unidade de tempo, geralmente expresso em s^{-1} . Recebe também o nome de número de reciclagem, o número máximo de moléculas transformadas por unidade de tempo (substrato, produto) por molécula de enzima ou número de sítios ativos. Sempre em condições de saturação de modo que a quantidade de substrato não seja limitante. As enzimas causam redução da energia de ativação por que se ligam ao estado ativado dos seus substratos, estabilizando-os e reduzindo assim seu nível energético. Portanto, assim como o K_M , o k_{cat} depende da estrutura tridimensional e da natureza química dos substratos e do centro ativo da enzima (Berg *et al.*, 2007; Nelson e Cox, 2011).

1.3.3 Constante de especificidade (k_{cat}/K_M) – é uma medida que relaciona a eficiência catalítica da enzima com a sua afinidade pelo substrato. Assim, a constante de especificidade é um modo eficaz de obter a constante de segunda ordem da velocidade para enzimas livres na reação com substrato livre para formação de produto já que as velocidades da reação variam diretamente com a frequência de colisões entre as moléculas de enzima e as de substrato na solução. A constante de especificidade é limitada pela frequência com que o substrato e a enzima se encontram na solução. A razão entre constantes de especificidade para dois substratos é uma comparação quantitativa da eficiência da enzima na conversão dos substratos. Valores baixos da

relação indicam pouca afinidade da enzima pelo substrato. A forma complementar, carga e características hidrofílicas/hidrofóbicas, são responsáveis por esta especificidade. As enzimas exibem também elevados níveis de estereoespecificidade, regioseletividade e quimioseletividade.

Bons substratos são aqueles que são rapidamente processados e que se ligam bem à enzima. Estes apresentam, portanto alta relação k_{cat}/K_M . Como podemos ver, um substrato que se liga muito bem, mas tem um ciclo de catálise longo não apresentará uma boa relação k_{cat}/K_M . Da mesma forma ocorre com aquele substrato que é rapidamente processado, ou seja, tem um ciclo catalítico rápido, mas que não apresenta um grau de afinidade adequado com a enzima. Substratos que não se ligam bem e são lentamente processados apresentarão valores de k_{cat}/K_M ainda mais baixos, significando que a atividade da enzima sobre eles é baixa (Berg *et al.*, 2007; Nelson e Cox, 2011).

Desta forma, a obtenção destes parâmetros de uma determinada enzima para substratos que diferem em sua sequência de aminoácidos, pode revelar informações importantes sobre a estrutura tridimensional do centro ativo desta enzima, bem como de sua afinidade com relação aos substratos naturais sobre os quais age.

A linguagem utilizada nos trabalhos científicos voltados para este tipo de estudo geralmente leva em conta a nomenclatura sugerida por Schechter e Berger (1967) já mencionado anteriormente.

Os valores dos parâmetros cinéticos se tornam bastante úteis como fonte de análise da estrutura do centro ativo de uma enzima quando se comparam substratos semelhantes na sua sequência polipeptídica, mas que diferem em uma posição. Por exemplo, um substrato do tipo Leu-Pro-Phe-Arg-pNA e outro semelhante Leu-Pro-Phe-Lys-pNA. É interessante observar que estes substratos só se diferem na posição P1, adjacente à ligação peptídica clivada. Enquanto o primeiro tem Arg em P1, o segundo apresenta um resíduo de Lys. O valor de K_M que este substrato apresentará para uma determinada enzima serão diferentes, e estas diferenças são resultado da:

1. Natureza do grupo que ocupa P1 no substrato
2. Interação deste grupo com a região S1 na enzima

Como esta interação é de natureza química, conhecendo as sequências peptídicas dos substratos, é possível obter algumas informações (afinidade enzima-sustrato, K_M , V_{max} , etc.) a respeito do centro ativo da enzima e de seus subsítios.

1.4 Hemostasia, coagulação sanguínea e fibrinólise

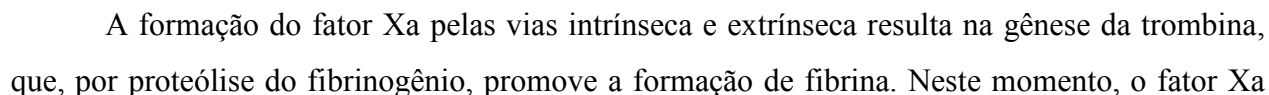
Hemostasia significa prevenção da perda de sangue. Ocorrendo lesão ou rompimento de um vaso sanguíneo a hemostase é alcançada através de alguns mecanismos: espasmo vascular, formação de um tampão plaquetário, formação de um coágulo sanguíneo e eventual crescimento de tecido fibroso para dentro do coágulo sanguíneo com o intuito de fechar permanentemente a lesão no vaso. Pode ocorrer ainda o que é denominado de fibrinólise, ou seja, a dissolução do coágulo por proteólise (Sajevic *et al.*, 2011; Campbell *et al.*, 2011).

O mecanismo fisiológico da coagulação (Figura 4) envolve complexas interações entre proteases do plasma sanguíneo e seus cofatores, acarretando uma ativação sinérgica de zimogênios, de tal forma que cada fator, em sua maioria serinoproteases com exceção dos fatores VIIa e XIIIa (Verstraete e Vermynen, 1989; Boon, 1993), comporta-se como substrato para a enzima anterior e ativador da proenzima subsequente. A atividade proteolítica limitada é responsável por grande parte das etapas de ativação. É interessante ressaltar que as inúmeras enzimas envolvidas na coagulação se localizam em superfícies celulares contendo fosfolipídios, especialmente em plaquetas. As membranas de plaquetas, quando ativadas, expressam sítios de ligação para os complexos fator IXa/fator VIIIa, conhecido como complexo “tenase” e fator Xa/fator Va, denominado complexo “protrombinase” (Franco, 2001). Adicionalmente, íons cálcio são necessários em diversos passos das reações de coagulação.

Duas vias distintas, a intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular) e a extrínseca (que envolve componentes do sangue, mas também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular), se entrelaçam e culminam em uma via comum para explicar o processo de coagulação (Barros *et al.*, 2009). A via intrínseca inicia-se com a ativação ou fase de contato, processo que envolve o fator XII, pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e o fator XI. Uma superfície contendo cargas elétricas negativas desencadeia a ativação e união dos fatores de contato, os quais são independentes de cálcio e fosfolipídios. Inicialmente, ocorre uma reação cíclica entre o fator XII e a précaliceína e, após o contato com a superfície, o fator XII é clivado em duas cadeias transformando-se no fator XIIa (forma ativa). Este, por sua vez, converte précaliceína em caliceína, que catalisa a sua própria geração por ativar o fator XII, acelerando a fase de contato.

Outro catalisador é o cininogênio de alta massa molecular, atua como uma molécula carreadora responsável por elevar a concentração dos fatores de contato. O fator XIIa ativa ainda o fator XI, que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IXa, na presença de fator VIII, ativa o fator X da coagulação. Na via extrínseca, ativada no momento da injúria, o fator VII plasmático se liga

Figura 4. Representação esquemática da interação da trombina-símile na via da cascata de coagulação dentro da hemostase humana (Ilustração modificada: White, 2005).



ativa o fator V e forma o complexo ativador protrombinase, citado anteriormente, o qual é responsável pela conversão de protrombina em trombina (Davie, 2003).

A trombina, uma serinoprotease endógena converte, por proteólise, o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel (Kornalik, 1985). O fibrinogênio plasmático é uma glicoproteína dimérica de alta massa molecular (340 kDa), apresentando em cada dímero três cadeias polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$ e γ), unidas por ligações dissulfeto (Wolberg, 2007). A sua degradação resulta na liberação dos fibrinopeptídeos A (FP-A) e B (FP-B) após a hidrólise das ligações Arg16–Gly17 e Arg15–Gly16 presentes, respectivamente, nas cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ da molécula.

A ativação do fator XIII da cascata de coagulação pela trombina resulta na formação de ligações cruzadas entre as cadeias fibrínicas promovendo a formação do coágulo sanguíneo denso.

Logo após a lesão do vaso sanguíneo ocorre vasoconstrição, para diminuir o fluxo local e permitir maior contato entre as plaquetas circulantes e a região danificada do endotélio, processo chamado de adesão plaquetária. Essa adesão ocorre em superfícies carregadas negativamente, por interações entre glicoproteínas de membranas, principalmente glicoproteínas Ib (GPIb), VI (GPVI) e complexo Ia/integrina IIa, com proteínas do subendotélio como fator de von Willebrand (vWF), colágeno, fibronectina e vitronectina (Kornalik, 1985).

O primeiro sistema de defesa contra a perda sanguínea se faz por meio deste *tampão plaquetário*. Desta forma, as plaquetas ativadas e aderidas ao endotélio liberam inúmeras substâncias que promovem a agregação das plaquetas, ativam o mecanismo da coagulação e diminuem a permeabilidade vascular. Os ativadores químicos como a adenosina-difosfato (ADP), trombina, catecolaminas e colágeno são essenciais para os processos de adesão e agregação plaquetária (Kornalik, 1985).

O passo seguinte é a deposição de uma rede fibrínica entre as plaquetas agregadas, o que contribui para estancar o sangramento. Como foi visto, a fibrina se forma por um mecanismo proteolítico. A ativação dos fatores da coagulação pode ocorrer pelas próprias plaquetas, contatos com superfícies carregadas negativamente e por células do vaso lesado. A cascata de coagulação é regulada por uma série de fatores, que impedem o crescimento descontrolado de trombo ou coágulo no interior do vaso (Franco, 2001).

Um sistema anticoagulante natural pode agir contrariamente aos mecanismos coagulantes. A antitrombina (AT) e a proteína C (PTN C), com participação do cofator proteína S (PTN S), são imprescindíveis para os recursos anticoagulantes deste sistema. Desta forma, a AT possibilita a formação de complexos inativados (ex: complexo trombina-antitrombina) que resultam na

remoção rápida de enzimas coagulantes da circulação. Na presença de trombomodulina, a PTN C é ativada pela trombina resultando na inibição da coagulação por proteólise do fator VIIIa e do fator Va (Franco, 2001).

Assim como o mecanismo de coagulação é responsável por impedir a perda excessiva de sangue, a última etapa da hemostasia, conhecida como fibrinólise, contribui para que não ocorra a formação desordenada de trombos intravasculares, evitando complicações tromboembolíticas.

Em síntese, a hemostasia compreende dois mecanismos opostos responsáveis pela formação e dissolução do coágulo de fibrina, os quais, simultaneamente, contribuem para a manutenção adequada do fluxo sanguíneo no interior dos vasos e se mantêm em equilíbrio pelas propriedades hemodinâmicas do sangue (Braud *et al.*, 2000).

1.5 Alterações teciduais causadas por proteases botrópicas

Envenenamentos por serpentes botrópicas podem resultar em alterações patológicas locais, as quais podem vir acompanhadas por uma série de efeitos deletérios sistêmicos (Warrell, 2004). As manifestações clínicas das alterações sistêmicas incluem sangramento, coagulopatia, hipotensão, alterações hemodinâmicas, edema pulmonar, falência renal aguda, hemólise intravascular, alterações hepáticas e miocárdicas agudas e, em muitos casos não tratados com a antiveneno, podem ocorrer falência múltipla dos órgãos e morte (Warrell, 2004).

Alterações teciduais locais podem ser resultantes do envenenamento por serpentes das famílias Viperidae e Elapidae (Warrell, 1995 e 2004). Toxinas botrópicas com ação citotóxica, especialmente metalo- e serinoproteases podem induzir efeitos patológicos como necrose de pele e músculo, bolhas cutâneas (Figura 5), hemorragia, danos em vasos linfáticos, degradação da matriz extracelular e inflamação (edema, infiltração leucocitária e dor) (Gutiérrez e Lomonte, 2003; Serrano e Maroun, 2005; Moura-Da-Silva *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009 e 2012), porém, a contribuição para a resposta inflamatória do veneno total é relativamente pouco compreendida.

Em envenenamentos ou em atividades experimentais direcionadas, os venenos ofídicos são injetados em posições anatômicas restritas e um gradiente de concentração de toxinas é estabelecido em diferentes áreas teciduais, variando ao longo do tempo. Tal gradiente depende do total de veneno injetado e da capacidade toxicocinética de cada proteína presente no tecido afetado. É provável que, em áreas em que a concentração de toxinas é mais elevada, os processos patológicos típicos predominem (Warrel, 2012a).

Em áreas mais periféricas, os efeitos patológicos seriam pouco pronunciados, pois provavelmente, necrose e rompimento de microvasos ocorrem concomitantemente, com fenômenos menos drásticos tais como apoptose, ativação e proliferação de alguns tipos de células. Mesmo em áreas de alto impacto citotóxico, existem células como macrófagos e fibroblastos que não são afetadas pela ação das toxinas, mas podem ser ativadas por expressão de genes, síntese e proliferação de mediadores inflamatórios e componentes da matriz extracelular. Estes fenômenos são similares às consequências descritas após o choque isquêmico, onde áreas necrosadas são cercadas por uma região de células menos severamente afetadas, em que a intervenção terapêutica eficaz reduz a extensão do dano isquêmico (Marsh e Williams, 2005).

A reação inflamatória local induzida por venenos botrópicos normalmente é resultante da ação combinada de diversas toxinas, atuando rapidamente em tecidos muscular e conjuntivo, promovendo a liberação de mediadores inflamatórios endógenos (Olivo Rdo *et al.*, 2007).

Apesar dos avanços significativos no entendimento da patogênese dos danos teciduais locais induzidos por venenos de serpentes, observações recentes sugerem que o conhecimento sobre este fenômeno é ainda limitado. O estudo deste aspecto é baseado em três suposições implícitas.



Figura 5. Acidentes com serpentes botrópicas. (A) Inchaço enorme do músculo e fasciotomia no lugar da mordida em um menino produzido pela serpente *Bothrops atrox* (Warrel, 2010). (B) Inchaço, bolhas, hematomas e necrose no local da mordida pela Jararaca (*Bothrops jararaca*) no dorso do pé em um menino brasileiro (Warrell, 2012b). (C) Necrose tecidual extensa do membro inferior em um menino de 11 anos que tinha sido mordido duas semanas antes por *Bothrops asper* no Equador. O grau de necrose é suficientemente grave que é inevitável a amputação cirúrgica acima do joelho (Gutiérrez *et al.*, 2006).

Primeira, o tecido e a resposta celular para a ação de toxinas têm sido vistos dentro de uma perspectiva dicotômica, ou seja, células são danificadas ou poupadas da ação das toxinas (Gutiérrez *et al.*, 1984).

Segunda, as respostas teciduais aos venenos foram consideradas homogêneas, no sentido que as alterações foram frequentemente investigadas por mudanças celulares na matriz extracelular e por componentes inflamatórios em homogeneizados de tecidos totais (Rucavado *et al.*, 2002).

Terceira, os efeitos patológicos locais foram estudados predominantemente pelos efeitos de toxinas purificadas e isoladas de venenos, sugerindo que o processo de envenenamento pode ser compreendido pela distinção do mecanismo de ação de toxinas individuais.

1.6 Importância das serinoproteases provenientes de veneno de serpentes na clínica

As principais causas de mortalidade e morbidade nos países desenvolvidos são as condições clínicas associadas a quadros trombóticos, como doenças cerebrovasculares isquêmicas, doenças vasculares periféricas e infarto do miocárdio, conhecidas como desordens aterotrombóticas. Destacam-se ainda as desordens trombóticas venosas, representadas pela embolia pulmonar e pela trombose profunda das veias (Ariëns *et al.*, 2002; Araujo, 2003; Dobromirski e Cohen, 2012).

A interação de fatores de risco aterogênicos como dislipidemias, hipertensão e diabetes com anomalias do sistema hemostático contribuem para as manifestações destas desordens, as quais geralmente levam muitos anos para se desenvolverem.

O infarto do miocárdio está relacionado ao aparecimento de um coágulo de fibrina rico em plaquetas e resistente à dissolução pela plasmina. A trombose venosa normalmente ocorre em pacientes geneticamente predispostos, com deficiências na síntese da proteína C ou da antitrombina III e, quando comparada às doenças arteriais, predominam os polímeros de fibrina e o número de plaquetas é reduzido.

As doenças cardiovasculares (DCVs) correspondem às desordens do coração e vasos sanguíneos e incluem doenças cardíacas coronárias, doenças cerebrovasculares, hipertensão, doenças arteriais periféricas e cardíacas reumáticas, anomalias cardíacas congênitas e falência cardíaca (Deng *et al.*, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 17,5 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2005, o que representa 30% das mortes globais. Em 2015, aproximadamente 20 milhões de pessoas morrerão de DCVs (Franchini e Mannucci, 2011).

A trombose intravascular é caracterizada pela agregação fibrínica em artérias, representando uma das principais causas de doenças cardiovasculares. Agentes trombolíticos estão sendo usados no tratamento terapêutico de trombose, destacando os ativadores de plasminogênio como tPA (ativador de plasminogênio tecidual), uroquinase e estreptoquinase. Apesar do seu uso difundido, todos estes agentes têm efeitos secundários indesejáveis e possuem preços relativamente elevados (Blann *et al.*, 2002).

A busca por outros agentes trombolíticos torna-se importante sob os aspectos terapêutico e econômico. Desta forma, moléculas antitrombóticas encontradas nos venenos de serpentes estão sendo purificadas e caracterizadas devido à alta eficácia que estes componentes apresentam no processo de dissolução de trombos (Escoubas e King, 2009).

O interesse médico por proteínas presentes em peçonhas ofídicas vem crescendo substancialmente devido às suas propriedades farmacológicas. Algumas enzimas trombina-símile de veneno de serpentes estão sendo utilizadas em laboratórios na detecção do fibrinogênio em amostras de sangue heparinizadas, na verificação do processo de formação da rede fibrínica, assim como na terapia antitrombótica, em transplantes de órgãos e em cirurgias vasculares (Marsh e Williams, 2005). Novamente, como citado anteriormente, tem-se como exemplo de moléculas desfibrinogenantes as enzimas batroxobina, ancrode (Arwin®) e crotalase. Merece especial atenção, uma enzima trombina-símile isolada do veneno de *Bothrops moojeni* denominada de BThTI, a qual destaca-se não só por suas propriedades anticoagulantes, como também pode ser utilizada como cola biológica em conjunto com outras substâncias (Oliveira e Homs-Brandeburgo, 2004).

É importante ressaltar ainda a importância da cola de fibrina utilizada em processos cirúrgicos como esplenectomia, preservação esplênica, trauma, neurocirurgias, microcirurgias oftalmológicas e cirurgias cardiotorácicas (Wang *et al.*, 1995). A cola de fibrina pode ser usada como agente hemostático e selante, a qual pode ser formada a partir do mecanismo de ação de enzimas trombina-símile que é similar à cascata de coagulação sanguínea por interromper o extravasamento sanguíneo por meio da proteólise do fibrinogênio, resultando em monômeros de fibrina, responsáveis pela formação do coágulo “frouxo”, o que favorece a reabsorção da cola por fibrinólise (Costa *et al.*, 2009).

Esses estudos permitem inferir que estas toxinas podem ser utilizadas como ferramentas para a investigação da função plaquetária, como também na elaboração de fármacos que atuam no equilíbrio hemostático e como agentes desfibrinogenantes terapêuticos (Bortoleto *et al.*, 2002).

1.7 Aspectos estruturais e funcionais de serinoproteases de veneno de serpentes

Muitas serinoproteases de veneno de serpentes foram isoladas e suas características estruturais e funcionais elucidadas, especialmente as pertencentes à família Viperidae (Serrano e Maroun, 2005). As sequências deduzidas por cDNA de muitas serinoproteases ofídicas revelaram um domínio altamente conservado na região amino-terminal, rico em resíduos de valina. O quadro 2 apresenta a sequência de aminoácidos da região N-terminal de algumas serinoproteases de veneno de serpentes citados mostrando o alto grau de homologia entre elas.

A estrutura tridimensional de uma proteína apresenta diferentes domínios estruturais e está diretamente relacionada à sua função biológica. Geralmente, a compreensão dos mecanismos relacionados à atividade catalítica de uma enzima requer a utilização de procedimentos que permitam a quantificação, a análise do grau de pureza e a estrutura parcial da biomolécula por meio da sequência N-terminal, podendo complementar outras técnicas mais sofisticadas como a obtenção da sequência completa utilizando métodos pertencentes à tecnologia do DNA recombinante (Shively *et al.*, 1989).

Quadro 2: Sequência N-terminal de serinoproteases isoladas de venenos ofídicos.

SVTLEs	N-terminal	Serpente	Referências	PMID
TLBan	VIGGDECNINEHPFL	<i>Bothrops andianus</i>	Valeriano-Zapana <i>et al.</i> , 2012	384950758
Baltermina	VIGGDECNINEHRSL	<i>Bothrops alternatus</i>	Costa <i>et al.</i> , 2010	20184912
Purpurase	VVGGDECNINEHRSL	<i>Cryptelytrops purpureomaculatus</i>	Tan, 2010	19770070
TLBm	VIGGDECNINESPFL	<i>Bothrops marajoensis</i>	Vilca-Quispe <i>et al.</i> , 2010	380875413
TI-Bp	VIGGDECDINEHPFL	<i>Bothrops pauloensis</i>	Costa <i>et al.</i> , 2009	19539638
Ba III-4	VIGGDECDINEHPFL	<i>Bothrops atrox</i>	Ponce-Soto <i>et al.</i> , 2007	
Catroxobina	VVGGDECNINEHRSL	<i>Crotalus atrox</i>	Pirkle <i>et al.</i> , 1989	2617466
Flavoxobina	VIGGDECDINEHPFL	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Shieh <i>et al.</i> , 1988	3170503
Crotalase	VIGGDECNINEHPFL	<i>Crotalus adamanteus</i>	Markland, Damus (1971)	5132665
Gabonase	VVGGAECKIDGHRCL	<i>Bothrops gabonica</i>	Pirkle <i>et al.</i> , (1986)	3522580
Batroxobina	VIGGDECDINEHPFL	<i>Bothrops atrox</i>	Stocker, Barlow (1976)	1011993
Botrombina	VIGGDECDINEHPFL	<i>Bothrops jararaca</i>	Nishida <i>et al.</i> , (1994)	8110787

Nota: Resíduos de aminoácidos conservados estão destacados em negrito.

Neste contexto, a Transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) permite determinar o DNA complementar (cDNA) e, assim, deduzir os aminoácidos. Pelo alinhamento múltiplo é possível comparar a sequência de aminoácidos e, portanto, a similaridade estrutural entre enzimas presentes em diferentes peçonhas ofídicas.

Costa *et al.*, (2010) purificaram e caracterizaram bioquimicamente uma enzima trombina-símile (balternina) do veneno de *Bothrops alternatus*. O produto de amplificação por PCR produziu um fragmento de cDNA de 708 pares de bases que codifica para a proteína madura de 236 resíduos de aminoácidos. O alinhamento múltiplo da balternina e de outras serinoproteases de peçonhas de serpentes mostrou que esta enzima apresenta similaridade entre 65 a 72 % com serinoproteases isoladas de diferentes gêneros ofídicos, por meio do sequenciamento total.

Embora exista alto grau de homologia entre as serinoproteases de veneno de serpentes, sugerindo a divergência a partir de uma molécula ancestral comum, a especificidade por diferentes substratos como fibrinogênio, cininogênio e plasminogênio é significativamente alta (Serrano e Maroun, 2005).

As bases moleculares que definem a especificidade das serinoproteases com atividade trombina-símile para o substrato ainda são pouco compreendidas. Desta forma, técnicas mais sofisticadas, como a cristalografia por raios-X de baixo ângulo e modelagem molecular são importantes para o estudo e compreensão da estrutura e função destas proteínas.

1.8. *Bothrops brazili*

Bothrops brazili (Figura 6A) é uma serpente peçonhenta comumente conhecida como “Jergón Shushupe” (Campbell e Lamar, 2004), pertencente à família Viperidae, subfamília Crotalinae. É amplamente encontrada na América do Sul, reportando-se sua presença em Brasil, Colômbia, Equador, Peru, Guiana, Suriname e Guiana Francesa (Campbell e Lamar, 1989). A serpente *Bothrops brazili* é endêmica da Floresta Amazônica, estando sua localização restrita as regiões de mata primárias ou pouco alteradas (Campbell e Lamar, 2004).

O veneno de *B. brazili* começou a ser estudado há 15 anos. Diversos trabalhos foram desenvolvidos utilizando o veneno desta serpente (Muniz *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2005), tais como relatos de algumas purificações e caracterizações parciais de componentes isolados do veneno, como é o caso de uma metaloprotease e o estudo de sua atividade sobre fibrinogênio (Azañero *et al.*, 2000), purificação e caracterização de uma L-amino oxidase (Solis *et al.*, 1999), características bioquímicas e ação biológica de uma hemorragina (Isla *et al.*, 2003), isolamento e

propriedades de uma Fosfolipase A₂ (Lazo *et al.*, 1998; Zeballos *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2008; Huancahuire-Vega *et al.*, 2009).

1.9. *Bothrops roedingeri*

É conhecida como “Jergón de la costa”, esta espécie geralmente não excede os 75 cm de comprimento, mas não são raros os espécimes de 100 cm. Estas são espécies endêmicas no Peru, e habitam as planícies costeiras do Pacífico desde o estado de “La Libertad” para o sul até o estado de Arequipa a partir do nível do mar pelo menos 500 m de altitude (Campbell e Lamar, 2004) (Figura 6B).

Seu veneno caracteriza-se por apresentar propriedades tipicamente hemotóxicas, com alguns fatores citotóxicos, como as de outras espécies do gênero *Bothrops*.

Atualmente não se tem relatos de purificação de serinoproteases com características trombina-símile a partir do veneno de *Bothrops roedingeri* e *Bothrops brazili*. Assim sendo o presente trabalho justifica-se pela necessidade de caracteriza-las a fim de compreender melhor este efeito coagulante desencadeado por estas proteínas.



Figura 6. Imagen da serpente e distribuição dos principais locais de ocorrência das espécies *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri*. (A) *Bothrops brazili* (adaptado de <http://get-id.com.br/Animais/Serpentes/Resultado.aspx>) (B) *Bothrops roedingeri* (Ministerio de salud - NT No. 007-MINSA/DGSP-V.01).

II. OBJETIVOS

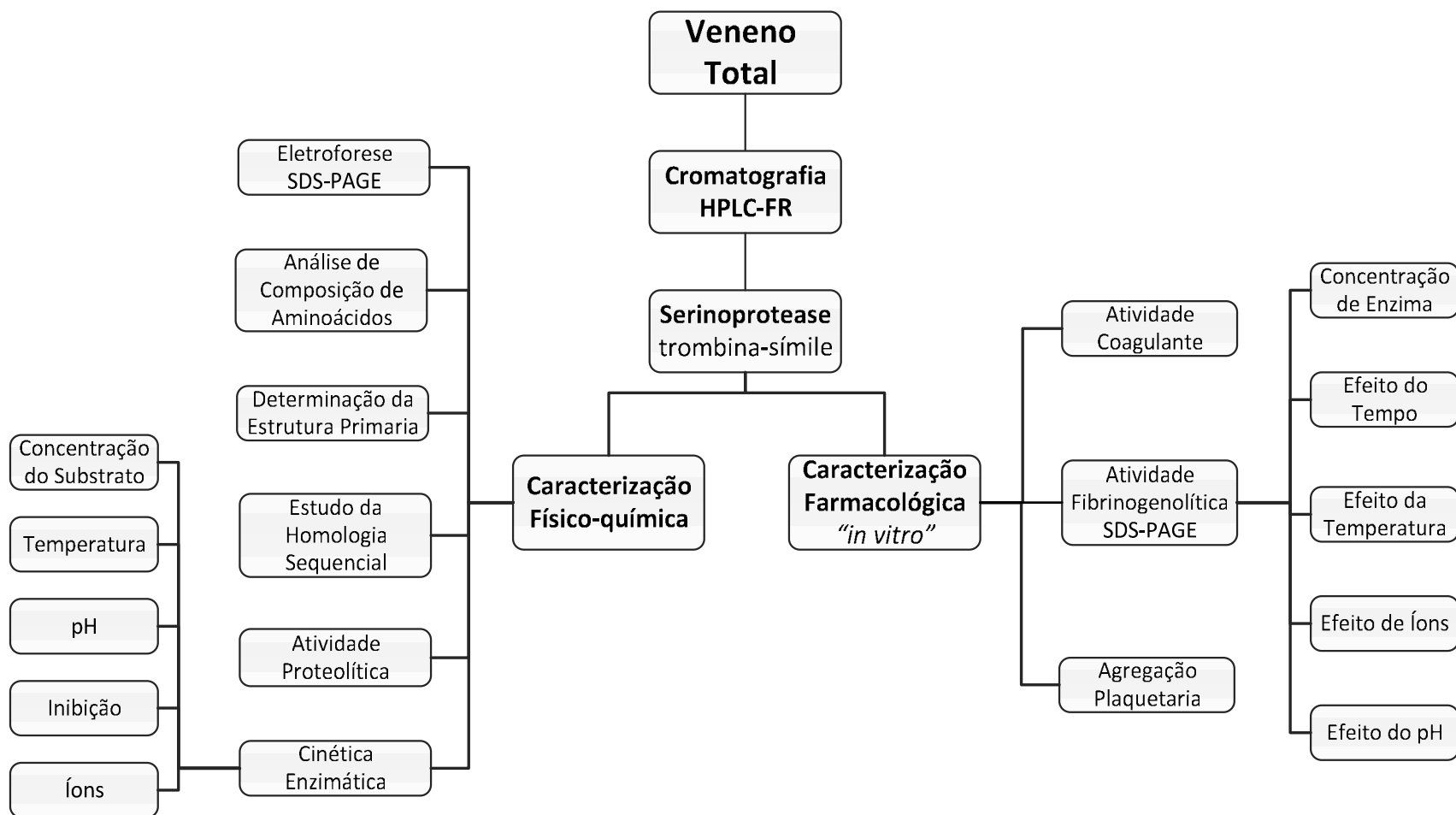
2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma metodologia com menor número de etapas para purificação de serinoproteases presentes nos venenos de *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri*.

Caracterização bioquímica e farmacológica da serinoprotease proveniente dos dois venenos visando à realização de estudos comparativos da atividade trombina-símile entre as mesmas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Purificar serinoproteases a partir do veneno total de *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri* utilizando metodologia cromatográfica em sistema HPLC de fase reversa.
- 2.2.2 Caracterizar físico-quimicamente as serinoproteases através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE), espectrometria de massa (ESI-QTOF-MS/MS), atividade proteolítica, inibição da atividade serinoprotease na presença de PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto) e determinação da composição de aminoácidos.
- 2.2.3 Estudo de homologia sequencial das enzimas trombina-símile procedentes do veneno de *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri* estabelecendo a contribuição de cada um dos aminoácidos das regiões conservadas quanto variáveis nas respectivas cadeias polipeptídicas.
- 2.2.4 Estudar a estabilidade química das enzimas trombina-símile isoladas, a partir do veneno de *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri* por meio de parâmetros cinéticos de temperatura e pH sobre a atividade proteolítica (BApNA).
- 2.2.5 Caracterizar farmacologicamente as serinoproteases isoladas através da atividade fibrinogenolítica e agregação plaquetária.



Para atingir os objetivos estabelecidos foi seguido o fluxograma representado na figura 7.

Figura 7. Fluxograma da caracterização estrutural e funcional de uma serinoprotease com atividade trombina-símile isolada a partir do veneno total de *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri*.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Venenos

Os venenos foram gentilmente cedidos pela Profa. Corina Vera do Instituto de Biomedicina e Biotecnologia da Universidade Nacional de “San Agustin” - UNSA (Arequipa – PERU).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem SWISS, com peso entre 18-20 g, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração, em ambiente com temperatura e iluminação controlada (12 horas com luz e 12 horas sem luz). Os experimentos com animais foram feitos de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP pertencente ao protocolo N° 1932-1 e 2755-1.

3.3 Reagentes

Todos os solventes, produtos químicos e reagentes utilizados são de grau HPLC, grau sequência ou de alto grau de pureza, obtidos da Sigma-Aldrich Chemicals, Merk e Bio-Rad.

3.4 Purificação:

3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência–fase reversa (HPLC-FR)

A fração com atividade serinoprotease foi purificada em uma coluna analítica μ -Bondapak C-18 (0,78 x 30 cm) HPLC de Fase Reversa. O sistema cromatográfico utilizado foi HPLC–PDA 991 (Waters) equipado com duas bombas Waters modelo 510/B, um injetor automático de amostras U6K com um “loop” de 200 μ L modelo Rheodyne 7725i, com detector Waters 2487 sendo previamente equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 %, pH 3,5 (Tampão A).

Quantidade de 5 mg de veneno total previamente dissolvido em 120 μ L de TFA 0,1 % e 80 μ L de bicarbonato de amônio – (NH_4HCO_3) 1 M pH 8,0 foram centrifugados a 9000 rpm durante 3 minutos e aplicados em cada corrida, sendo eluídas as frações a um fluxo constante de 1 mL/min. A eluição das amostras foi realizada através de um gradiente linear com acetonitrila 66% em TFA 1 % (Tampão B). A concentração das frações eluídas foi monitorada pela alteração da absorbância em 280 nm. Estas frações coletadas foram liofilizadas imediatamente e estocadas a -20 °C.

3.5 Caracterizações Físico-químicas

3.5.1 Atividade proteolítica sobre o BApNA

O substrato cromogênico sintético, $N\alpha$ -Benzoil-DL-Arginil p -Nitroanilida (DL-BApNA) foi utilizado para a dosagem da atividade proteolítica das amostras (Figura 8). Este substrato tem sido empregado para medir a atividade amidásica de enzimas proteolíticas tais como: tripsina, quimiotripsina, fator Xa, calicreína plasmática humana, trombina e plasmina humana. Este substrato, peptídeo derivado de p -nitroanilida, tem sido amplamente utilizado principalmente pela alta sensibilidade fotométrica na absorvância de 405 nm da p -nitroanilida liberada após hidrólise enzimática, segundo o método de Erlanger *et al.*, (1961), sendo feito as modificações para microplaca por Vilca-Quispe *et al.*, (2010).

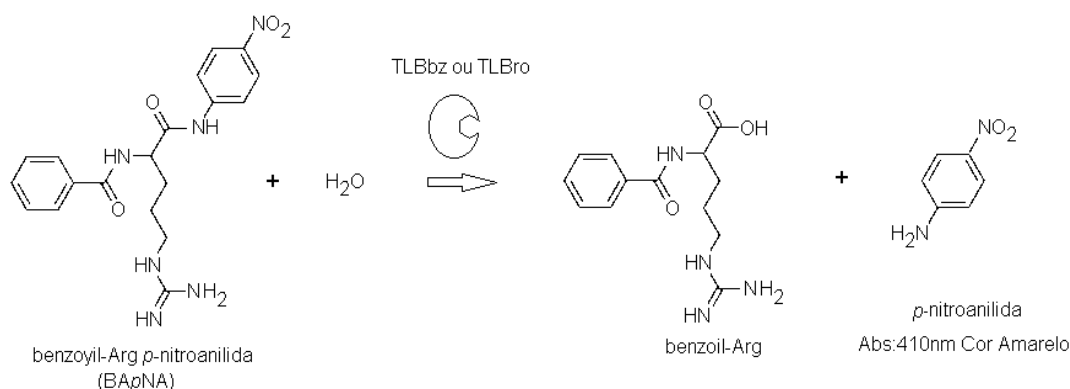


Figura 8. Mecanismo catalítico do das enzimas TLBbz ou TLBro no substrato cromogênico $N\alpha$ -benzoil-Arg-pNA.

O substrato cromogênico sintético BApNA foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) 43,6 mg/mL e 10 μ L desta solução foi misturada em 1 mL de tampão (Tris-HCl, 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM, NaCl 100 mM) pH 7,8 formando assim a solução substrato cromogênico sintético (0,1 M).

A mistura para o ensaio da atividade proteolítica contve 45 μ L de tampão (Tris-HCl 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM, NaCl 100 mM) pH 7,8; 180 μ L de solução de substrato cromogênico BApNA (0,1 M), 10 μ L de água e 5 μ L da amostra, com volume final de 240 μ L. Após a adição de 5 μ L da amostra em teste, a mistura foi colocada em um meio de incubação, por 30 minutos, a 37 $^{\circ}C$, e as absorvâncias foram lidas em intervalos de 10 minutos. A atividade enzimática foi baseada no aumento da absorvância após 20 minutos, através da liberação do cromóforo p -

nitroanilida. O ensaio foi realizado em triplicata e a reação lida a 405 nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Para os cálculos utilizou-se o valor de $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do produto p-nitroanilida. As velocidades de reação das amostras foram medidas e calculadas em unidades de nmol/minuto. Os controles foram feitos com os reagentes seguindo os mesmos procedimentos e substituindo o volume da amostra por água destilada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima presente na amostra capaz de liberar 1 μmol de p-nitroanilida por minuto, nas condições descritas.

3.5.2 Determinação das massas moleculares da fração TLBbz e TLBro por Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970) em um sistema duplo de placas “Mighty Small SE 250” (Hoefer Scientific Instruments). As placas de géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram feitas de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5 % (stacking gel) e um gel de corrida de 12,5 % (running gel) preparados a partir de uma solução de acrilamida estoque a 30 % e N,N,metileno-bisacrilamida a 0,8 % (Bio-Rad Labs. Richmond, CA, USA) dissolvidos em água Milli-Q deionizada (Millipore-Waters Co.).

O gel de corrida (running gel) foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8; SDS 20 %; N-N-N-N-Tetrametiletilenediamina (TEMED) 0,1 % e persulfato de amônio (PSA) 10 %, para a polimerização. Depois de polimerizado o gel de corrida, foi preparado o gel superior ou gel de concentração (stacking gel) com 5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8; SDS 20 %, TEMED 0,1 % e persulfato de amônio 10 %.

Tanto as amostras quanto os marcadores foram dissolvidos no tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075 M, pH 6,8; Glicerol 10 %; SDS 4 % e azul de Bromofenol 0,001 %). A redução das amostras foi feita com Ditioneitol (DTT), em uma concentração final de 0,1 M. Estas amostras diluídas foram fervidas a 95 °C durante 5 minutos; 10 μl de cada amostra e 15 μl do marcador molecular foram aplicados separadamente nos pocinhos do gel.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada com tampão de corrida (Tris-HCl 0,025 M; glicina 0,192 M com SDS 1 mM pH 8,3) usando uma amperagem constante de 30 mA e voltagem livre durante 90 minutos. Foram usados como padrão os seguintes marcadores de massa molecular, obtidos da Pharmacia: fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa),

ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e lisozima (14 kDa).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 (0,05 %). O gel foi embebido em solução corante por 12 horas “overnight”. Em seguida, o excesso de corante do gel foi lavado e retirado com solução descorante (ácido acético 10 %) e finalmente a reação foi interrompida com a adição de água.

3.5.3 Análise e estudo da homologia sequencial da TLBbz e TLBro

3.5.3.1 Redução e alquilação

A fração TLBbz e TLBro foram ressuspensas em uréia 8 M contendo DTT 10 mM a pH 8 e incubada a 37 °C por duas horas para redução das pontes dissulfeto. Como o número de resíduos de cisteína na proteína inicialmente eram desconhecidos, a concentração ótima de Iodoacetamida utilizada para alquilar os grupos tióis livres a partir dos resíduos de cisteína reduzidos, foi obtida de forma empírica com base nos resultados a partir de incubações utilizando diferentes concentrações de iodoacetamida. Com base nesses experimentos preliminares foi escolhido um excesso molar relativo de 30 % de iodoacetamida em relação ao número total de tióis e a mistura foi incubada por 1,5 horas a 37 °C em escuridão total. A reação foi bloqueada injetando a mistura em uma coluna de HPLC de fase reversa seguida da liofilização dos picos coletados.

3.5.3.2 Hidrólise enzimática

A proteína purificada foi hidrolisada com tripsina pancreática bovina de grau sequencia em bicarbonato de amônio 0,4 % pH 8,5 durante 4 horas a 37 °C em uma proporção enzima:substrato de 1:100 (v/v). A reação foi encerrada por liofilização.

3.5.3.3 Sequencia de aminoácidos deduzidas por espectrometria de massa dos peptídeos trípticos

Todos os espectros de massa foram adquiridos usando um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo Q-TOF (Quadrupole Time-of-Flight) última em micromassa (ESI-QTOF-MS/MS, Micromass Manchester, UK), equipado com um sistema de fonte nano spray operando em modo de ionização positivo. As condições de ionização de uso incluem: voltagem capilar de 2,3 kV, um cone de voltagem e lente RF1 de 30 e 100 V respectivamente, e uma energia de colisão de 10 V. A temperatura da fonte foi 70 °C e o cone do gás foi N₂ a um fluxo de 80 L/h;

não foi empregado gás nebulizador para obter o spray. O gás argônio foi utilizado para o resfriamento e fragmentação dos íons na colisão dentro da célula. A calibração externa foi realizada com iodeto de sódio em uma faixa de massas a partir de 50 até 3000 m/z. Todos os espectros foram adquiridos com o analisador TOF em modo “Vmode” (TOF = 9,1 kV) e a voltagem conjunto MCP a 2150 V.

Os peptídeos tripticos alquilados a partir da TLBbz e TLBro foram separados em HPLC de fase reversa, liofilizados e ressuspensos em 20 % de acetonitrila e 0,1 % de TFA. Cada peptídeo foi introduzido separadamente na fonte do espectrômetro de massa com uma seringa a um fluxo de 500 nL/min. Antes de realizar os espectros de massa em *tandem* um espectro ESI/MS (modo TOF-MS) foi realizado para cada pico obtido do HPLC de fase reversa na faixa de 400–2000 m/z para selecionar os íons de interesse. Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de massa de 1000-2800 m/z para a proteína nativa sobre o intervalo de 800-2000 m/z para as proteínas alquiladas, ambas a uma velocidade de varredura de 1 s/scan. Posteriormente esses íons foram fragmentados na célula de colisão (modo TOF MS/MS). Um estudo de sobreposição de peptídeos obtidos da digestão pela tripsina será realizado, a partir da cadeia polipeptídica e massa determinada. Por fim, o alinhamento dos fragmentos peptídicos e sua homologia estrutural é realizado com outras serinoproteases trombina-símile de veneno de serpentes disponíveis em bancos de dados, dentre eles o NCBI-BLAST (Altschul, 1990).

3.5.4 Análise de composição de aminoácidos

A análise de composição de aminoácidos foi realizada em um sistema analisador automático de aminoácidos PICO-TAG (Sistema Waters) seguindo a metodologia descrita por Henrikson e Meredith (1984) onde a identificação dos aminoácidos é feita através da cromatografia em HPLC do produto feniltiocarbamil do aminoácido, proveniente da derivatização com feniltiocianato dos aminoácidos obtidos de hidrólise ácida. Estas formas de cromóforos podem ser detectadas em concentrações de 1,0 pmol.

As proteínas purificadas (~30 µg) foram submetidas as reações de hidrólise através de diluições das amostras em solução de acetonitrila 66 %, 10 µL dessa solução o equivalente a 2 nmoles de amostra foram secadas em vácuo, seguida de uma reação ácida de HCl/Fenol 6 N (grau de sequenciamento) contendo 1 % de fenol (w/v) por 24 horas a 105 °C. As etapas anteriores à análise foram de “redrying” (basificar o ácido depois da hidrólise para conseguir o pH correto) e derivatização. O hidrolisado reagiu com 20 µL da solução de derivatização (etanol:triethylamina:água:fenilisotiocianato, 7:1:1:1, v/v) durante uma hora, à temperatura

ambiente. Os aminoácidos derivatizados (PITC aminoácidos) das amostras foram identificados através da cromatografia em HPLC em uma coluna de fase reversa C-18 μ -Bondapak (3,9 mm x 15 cm) de acordo com o tempo de retenção dos PITC-aminoácido padrão com uma gradiente linear de 0 a 100 % de acetonitrila (60 %) por 21 min. Os PITC aminoácidos foram identificados no analisador automático de PITH aminoácidos modelo 120A (Applied Biosystem) de acordo com o tempo de retenção e as áreas dos picos dos 20 PITC aminoácidos padrão.

Preparação da amostra

a) Redução e alquilação

Uma quantidade aproximada de 30 μ g da serinoprotease proveniente da cromatografia em C-18 μ -Bondapak foi dissolvida em água e acetonitrila (1:1, v/v) e transferida para pequenos tubos de reação de 20 μ L de volume. Estes tubos foram colocados dentro do frasco de reação, que possui uma tampa especial, para conexão com o sistema de vácuo e atmosfera de nitrogênio.

À proteína dissolvida em tampão completo de redução; Tris-HCl 0,6 M, pH 8,2 contendo EDTA 0,001 M e guanidina 6 M, foi adicionada uma solução de DTT 5 mM e a solução foi incubada por uma hora sob atmosfera de nitrogênio. A proteína reduzida foi alquilada com ácido iodoacético 0,1 M durante uma hora à temperatura ambiente. Retirou-se o sal da amostra em Sephadex G-25 em ácido acético 1,0 M e monitoradas em 220 nm. Os tubos contendo proteína foram liofilizados.

b) Hidrólise ácida

Esta etapa é efetuada colocando no fundo do frasco de reação contendo a proteína 100 μ L de uma solução de HCl 6,0 M, além de 1,0 mg/mL de fenol para evitar a formação de clorotirosina. Em seguida é feito vácuo próximo de 1–2 torr até início do borbulhamento do HCl. Fechado o vácuo, deixa-se entrar nitrogênio (SS-ultra puro) por 5 s. Esta etapa é repetida por 3 vezes. A seguir remove-se a tampa do frasco de reação, e a amostra é levada ao forno de hidrólise, a 105 °C, durante 24 horas. Após este período o tubo de reação é colocado ao vácuo até 65 millitorr para secagem da proteína hidrolisada.

c) Derivatização

Após a hidrólise ácida, foi adicionado à amostra 20 μ L de uma solução de metanol:água:triethylamina (2:2:1 v/v). Cada tubo foi agitado, centrifugado e colocado para

evaporar em vácuo até 65 militorr. Este procedimento remove sais e solventes adsorvidos nos aminoácidos. Uma solução fresca de derivatização foi preparada com metanol:triethylamina:água:feniltiocianato, na proporção 7:1:1:1 v/v, sendo adicionados 20 µL a cada tubo de reação e deixados a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a derivatização, a amostra é seca a vácuo até 50 militorr, para completa remoção de todo o PITC. A amostra foi dissolvida em 50 µL de uma solução 0,4 mM de tampão fosfato de sódio contendo 0,05 M de acetonitrila. A análise dos aminoácidos PITC foi realizada em HPLC, usando coluna C-18 µ-Bondapak (3,9 mm x 15 cm) em cromatografia de fase reversa com uma gradiente linear de 0 a 100 % de acetonitrila 60 % por 21 min. A identificação de cada aminoácido foi realizada em relação a uma corrida padrão de aminoácidos PITC (Bidlemeier *et al.*, 1984).

3.5.5 Estudos cinéticos da enzima TLBbz e TLBro

3.5.5.1 Efeito da concentração do substrato

Para a determinação do efeito da concentração do substrato da serinoprotease, o ensaio foi realizado seguindo a mesma metodologia descrita na atividade proteolítica sobre o substrato sintético N-benzoil-L-arginina- ρ -nitroanilida (BAPNA) (Item 3.5.1).

A variação da concentração do substrato foi feita em diluições seriadas de substrato cromogênico BAPNA (10; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1563; 0,0782; 0,039; 0,0195 e 0,0098 mM). A mistura para o ensaio efeito da concentração do substrato da atividade proteolítica conteve 45 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM) pH 7,8; 180 µL de solução de substrato cromogênico BAPNA (diluições seriadas), 10 µL de água e 5 µL da amostra, com volume final de 240 µL. Depois de colocar a enzima (5 µL) nas diferentes concentrações, foi incubada e lida durante 40 min a 37 °C a intervalos de 10 minutos cada leitura. A atividade enzimática foi baseada no aumento da absorbância, através da liberação do cromóforo ρ -nitroanilida que foi detectado na absorbância de 405 nm. A atividade foi expressa como a velocidade de reação (V_0) e foi calculada baseada na ρ -nitroanilida liberada após a catálise. As velocidades das amostras foram calculadas em unidades de nmoles/minuto. Os controles foram feitos apenas com os reagentes, seguindo os mesmos procedimentos e substituindo o volume da amostra por água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata e a reação foi lida na absorbância em 405 nm em um leitor de microplacas VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

3.5.5.2 Efeito da temperatura

O experimento para a observação do efeito da temperatura sobre a atividade da serinoprotease foi realizado segundo o método descrito no item 3.5.5.1, com o ensaio padrão contendo: 180 μL de substrato, 10 μL de água deionizada, 45 μL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl_2 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) e 5 μL da serinoprotease (TLBbz e TLBro). Os controles foram feitos apenas com os reagentes, seguindo os mesmos procedimentos e substituindo o volume da serinoprotease por água destilada. A temperatura variou-se de 15 - 70 $^{\circ}\text{C}$, foram mantidas por 40 minutos e lidas a intervalos de 10 minutos a 405 nm em um leitor VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). O ensaio foi realizado em triplicata.

3.5.5.3 Efeito do pH

O experimento do efeito do pH sobre a atividade serinoprotease foi realizado em tampões preparados com diferentes valores de pH (2,0 ate 10,0), sendo que a determinação da atividade serinoprotease e a concentração da enzima foram idênticas ao usado no item 3.5.5.1 e para cada pH é feito um controle. Os tampões utilizados neste experimento foram: tampão citrato de sódio-HCl (pH 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0) 15 mM, tampão fosfato-NaCl (pH 6,0 e 7,0) 15 mM, tampão Tris-HCl (pH 8,0) 15 mM e tampão glicina-NaOH (pH 9,0 e 10,0) 15 mM respectivamente. Depois de colocar a enzima (5 μL) nos diferentes tampões de pH, foi incubada e lida durante 40 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ a intervalos de 10 minutos cada leitura. O ensaio foi realizado em triplicata e a reação lida a 405 nm em um leitor VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). As velocidades das amostras foram calculadas em unidades de nmoles/minuto usando-se como coeficiente de extinção molar do produto p-nitroanilida o valor de 8800 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os controles foram feitos apenas com os reagentes, seguindo os mesmos procedimentos e substituindo o volume das serinoproteases ou proteína por água destilada.

3.5.5.4 Inibição da atividade serinoprotease por PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto) e outros inibidores

A atividade específica da serinoprotease frente aos diferentes inibidores foi calculada seguindo o mesmo protocolo para a determinação da atividade proteolítica no item 3.5.5.1. A serinoprotease foi diluída em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 na proporção de 1 mg/mL e foi pré-incubada com o inibidor PMSF (5 mM) por 15 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ antes de acrescentar ao meio de reação. As proporções da enzima serinoprotease com o inibidor estão em 1:1 (v/v). Depois disso,

a amostra pré-incubada foi colocada no meio de reação e a velocidade expressa em quantidades de produto formado de p-nitroanilina liberado após catálise.

Assim como o PMSF, também foi avaliado a atividade serinoprotease perante o ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 5 mM dissolvido em água deionizada (agente quelante de diversos íons metálicos), ácido glicol-bis (2 aminoetileter) –N,N,N,N-tetracético (EGTA) 5 mM, inibidor tripsina de soja (SBT1) 5 µg/µL (possui a habilidade de inibir a tripsina e quimiotripsina) dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,8 e Soro de *Didelphis marsupialis* (Dm) 1 mg/mL (agente neutralizante do veneno botrópico) dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,8. Todos estes inibidores também foram feitos nas mesmas condições que o PMSF com proporções da serinoprotease com o inibidor em 1:1 (v/v), os ensaios foram realizados em triplicatas e as reações lidas em 405 nm em um leitor VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A atividade proteolítica residual foi calculada como atividade percentual em relação à preparação controle que é a serinoprotease sem agente inibidor, a qual foi considerada 100 % da atividade.

3.5.5.5 Efeito dos íons divalentes sobre a atividade enzimática.

Da mesma forma, a atividade enzimática foi observada perante o efeito dos íons divalentes: cálcio, magnésio, manganês, zinco e cádmio em concentrações de 10 mM; estes íons foram dissolvidos com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e o substrato sintético N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) 10 mM por separado para cada íon divalente. O tampão contendo o substrato BAPNA e os diferentes íons foram incubadas por 10 minutos antes de acrescentar a enzima (TLBbz e TLBro) diluída em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 na proporção de 1 mg/mL e pre-incubada com os íons por 10 minutos a 37 °C.

O produto de hidrólise do cromóforo obtida pela adição de 5 µL de amostra (serinoprotease) foi analisado pela absorbância em 405 nm em um leitor VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A atividade proteolítica residual foi calculada como atividade porcentual em relação à preparação controle (enzima sem íons), considerada 100 % de atividade.

3.6 Caracterizações Farmacológicas

3.6.1 Atividade coagulante

A medida quantitativa foi realizada pelo método desenvolvido por Ware e Seegers (1949) e modificado conforme descrito abaixo.

Para a determinação da atividade coagulante das amostras (TLBbz e TLBro) foi utilizado fibrinogênio bovino na concentração de 2 mg/mL (0,2 %). A fração purificada e as outras frações obtidas foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 na proporção de 1 mg/mL. A mistura para o ensaio da atividade coagulante conteve 900 µL da solução de fibrinogênio (0,2 %), 100 µL de CaCl₂ (10 mM) e 20 µL da amostra para um volume final de 1020 µL.

A atividade coagulante foi determinada medindo-se o tempo de coagulação em tubos de ensaio de vidro (1,0 x 7,0 cm) ao primeiro sinal da formação da rede de fibrina visível, após a adição de 20 µL da amostra sobre a solução de fibrinogênio previamente incubado com CaCl₂ 10 mM a 37 °C durante 10 minutos (m/v, em função de proteínas coaguláveis), em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4. O tempo máximo da reação para a formação da rede de fibrina foi de 2 minutos, uma vez que neste intervalo existe uma relação retilínea entre os inversos dos tempos de coagulação e as respectivas concentrações protéicas. A coagulação é expressa como índice de coagulação (IC) obtido pela equação: $IC = t^{-1} \times 1000$, onde t^{-1} = inversa do tempo. A dose mínima coagulante (MCD) é definida como a menor quantidade de veneno ou fração purificada capaz de coagular o fibrinogênio dentro de 1 minuto (Cavinato *et al.*, 1998)

O número de unidades de coagulação é definido como a quantidade de enzima que coagula 1,0 mL de uma solução padrão de fibrinogênio em 15 segundos a 37 °C. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.6.2 Atividades Fibrinogenolíticas

3.6.2.1 Efeito da concentração de enzima na degradação do fibrinogênio

O efeito da concentração de enzima na degradação do fibrinogênio foi determinado segundo metodologia descrita por Edgar e Prentice (1973) com algumas modificações de acordo com Rodrigues *et al.*, (2000). O experimento foi realizado utilizando fibrinogênio bovino na concentração de 2,0 mg/mL (0,2 %) ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 e solução de CaCl₂ 10 mM. 900 µL da solução de fibrinogênio foi misturada com 100 µL da solução de CaCl₂ 10 mM, ambas soluções foram incubadas por 10 minutos. As enzimas TLBbz e TLBro foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 na proporção de 1 mg/mL para logo fazer diluições seriadas e obter concentrações diferentes: 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10 e 20 µg contidos em

20 µL que foram adicionados e incubados na solução de fibrinogênio e mantidas a 37 °C por duas horas. Após este tempo a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução desnaturante contendo Uréia 8,5 M, SDS 2 %, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM, β-Mercaptoetanol 10 % e azul de bromofenol 0,05 % seguida por fervura a 100 °C durante 5 minutos. Finalmente as amostras foram analisadas por SDS-PAGE 12,5 % segundo a metodologia descrita no item 3.5.2.

3.6.2.2 Efeito do tempo na degradação do fibrinogênio

Esta atividade foi avaliada em gel descontinuo de Poliacrilamida (SDS-PAGE) como estabelecido por Laemmli (1970) e Ouyang e Teng (1976). Foram preparados vários tubos de ensaio contendo 900 µL da solução de fibrinogênio 0,2 % (2 mg/mL tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8) misturados com 100 µL de uma solução salina (CaCl₂ 10 mM pH 7,8) e em seguida incubados por 10 minutos a 37 °C. Após este tempo foram adicionados independentemente a cada tubo 20 µL da TLBbz ou TLBro (1 mg/mL tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,8).

Esta mistura contendo a solução de fibrinogênio com as amostras foram incubadas por diferentes períodos de tempo: 0h, 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h e 36h. Após destes tempos, as reações foram interrompidas com 100 µL de uma solução desnaturante contendo uréia 8,5 M, β-Mercaptoetanol 10 %, SDS 2 %; EDTA 2 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e azul de bromofenol 0,05 % seguida por fervura a 100 °C durante 5 minutos; para depois serem analisadas em SDS-PAGE 12,5 % segundo a metodologia descrita no item 3.5.2.

3.6.2.3 Efeito do pH na degradação do fibrinogênio

O efeito do pH sobre a atividade fibrinogenolítica da trombina-símile TLBbz e TLBro foi realizado segundo o método descrito no item 3.6.2.1 com tampões preparados em diferentes valores de pH (2,0 – 10,0). Se utilizou fibrinogênio bovino na concentração de 2,0 mg/mL (0,2 %) ressuspenso com tampões preparados em diferentes valores de pH e solução de CaCl₂ 10 mM. Os tampões utilizados neste experimento foram: tampão citrato de sódio-HCl (pH 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0) 15 mM, tampão fosfato-NaCl (pH 6,0 e 7,0) 15 mM, tampão Tris-HCl (pH 8,0) 15 mM e tampão glicina-NaOH (pH 9,0 e 10,0) 15 mM respectivamente. Após preparar as soluções de fibrinogênio a diferentes pH, 900 µL da solução de fibrinogênio foram misturadas com 100 µL da solução de CaCl₂ 10 mM (cada tubo com soluções de pH diferente), ambas soluções foram incubadas por 10 minutos. As enzimas TLBbz e TLBro foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 na proporção de 1 mg/mL e desta preparação 20 µL foram adicionadas separadamente e incubadas na solução de fibrinogênio e mantidas a 37 °C por duas horas. Após este tempo a

reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de solução desnaturante contendo Uréia 8,5 M, SDS 2 %, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM, β -Mercaptoetanol 10 % e azul de bromofenol 0,05 % seguida por fervura a 100 °C durante 5 minutos. Finalmente as amostras foram analisadas por SDS-PAGE 12,5 % segundo a metodologia descrita no item 3.5.2.

3.6.2.4 Efeito da temperatura na degradação do fibrinogênio

Esta atividade foi avaliada em gel descontínuo de Poliacrilamida (SDS-PAGE) como estabelecido por Laemmli (1970) e Ouyang e Teng (1976). Foram preparados vários tubos de ensaio contendo 900 μ L da solução de fibrinogênio 0,2 % (2 mg/mL tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8) misturados com 100 μ L de uma solução salina (CaCl_2 10 mM pH 7,8) e em seguida incubados por 10 minutos a 37 °C. Após este tempo foram adicionados independentemente a cada tubo 20 μ L da TLBbz e TLBro (na concentração de 1 mg/mL tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,8) por separado.

Estes tubos contendo a solução de fibrinogênio com as amostras foram incubados em diferentes temperaturas: 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C durante duas horas, depois deste tempo, as reações foram interrompidas com 100 μ L de uma solução desnaturante contendo uréia 8,5 M, β -Mercaptoetanol 10 %, SDS 2 %, EDTA 2 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e azul de bromofenol 0,05 % seguida por fervura a 100 °C durante 5 minutos; para depois serem analisadas em SDS-PAGE 12,5 % segundo a metodologia descrita no item 3.5.2.

3.6.2.5 Efeito dos íons na degradação do fibrinogênio

O efeito dos íons divalentes sobre a atividade fibrinogenolítica da TLBbz e TLBro foi realizado segundo o método descrito no item 3.6.2.1. Se preparou soluções 10 mM de diferentes íons provenientes das sais $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , e CdCl_2 . O fibrinogênio bovino na concentração de 2,0 mg/mL (0,2 %) foi ressuspensionado nas soluções de diferentes íons preparados. Após preparar as soluções de fibrinogênio com diferentes íons; estas foram misturadas na seguinte proporção: 900 μ L da solução de fibrinogênio foi misturada com 100 μ L da solução de CaCl_2 10 mM (cada tubo com soluções de diferentes íons), ambas soluções foram incubadas por 10 minutos. As enzimas TLBbz e TLBro foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 na proporção de 1 mg/mL e desta preparação 20 μ L foram adicionadas e incubadas na solução de fibrinogênio e mantidas a 37 °C por duas horas. Após este tempo a reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de solução desnaturante contendo Uréia 8,5 M, SDS 2 %, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM, β -Mercaptoetanol 10 % e azul de bromofenol 0,05 %

seguida por fervura a 100 °C durante 5 minutos. Finalmente as amostras foram analisadas por SDS-PAGE 12,5 % segundo a metodologia descrita no item 3.5.2.

3.6.3 Determinação da Agregação plaquetária

O método de Born (1963) e Leet *et al.*, (2003) foi utilizado para a dosagem da agregação plaquetária que visa quantificar a formação dos agregados plaquetários “in vitro” quando estimuladas as plaquetas.

Para este ensaio foram coletados 10 mL de sangue de 10 camundongos com oito semanas de idade com pesos de aproximadamente 20 g, previamente anestesiados com halotano. O sangue foi coletado da aorta abdominal usando uma agulha número 25 montada em uma seringa de poliestireno contendo 1 volume de ACD (Citrato trissódico dihidratado 85 mM, ácido cítrico monohidratado 66,6 mM e D(+)glucose anidro 111 mM) para 6 volumes de sangue (este anticoagulante inibe a agregação durante o processo de lavagem das plaquetas sendo eficiente para quelar cálcio); o tubo de coleta foi homogeneizado por inversão lenta, e mantido a temperatura ambiente. A quantidade de sangue obtido de cada camundongo com peso de 20 g foi de 1 mL aproximadamente.

Para a preparação dos estudos da agregação plaquetária, o sangue total foi colocado em banho maria a 37 °C por 30 minutos. Depois foi imediatamente centrifugado a 180 g por 10 minutos, à temperatura ambiente. Logo, o plasma rico em plaquetas (o sobrenadante) foi transferido cuidadosamente usando uma pipeta plástica a outro tubo de poliestireno contendo tampão de lavagem pH 6,0 (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, citrato de sódio 12 mM, glicose 10 mM e sacarose 10 mM) na proporção 5:7 (v/v) e centrifugado a 800 g por 12 min a 20 °C, sendo o sobrenadante desprezado. O resíduo plaquetário foi cuidadosamente ressuspenso em solução de Krebs desprovida de cálcio (Radomski e Moncada, 1983). A centrífuga usada foi Fanem Excelsa 204-NR (FANEM - São Paulo - Brasil). Essas centrifugações e a conservação das amostras foram feitas em tubos vedados para evitar a perda de CO₂, que eleva o pH, interferindo nas curvas de agregação plaquetária.

As plaquetas lavadas foram mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos antes de começar o ensaio, mas as alíquotas foram aquecidas a 37 °C por 2 minutos antes da adição da enzima serinoprotease TLBbz, TLBro ou o ADP na cubeta do agregômetro para o teste e registro da agregação plaquetária.

A medida foi realizada usando-se um agregômetro de plaquetas de um único canal (Agregômetro de Plaquetas PA-04, Qualitem Eletrônica, Brasil). Antes de começar o ensaio, o

agregômetro foi previamente calibrado com as plaquetas lavadas no mínimo de transmitância e com solução de Krebs no máximo de transmitância. Esse ajuste é automático. Com isso, foi possível determinar uma amplitude para o registro da agregação das plaquetas.

Os ensaios foram realizados a 37 °C com 500 µL de plaquetas lavadas e a agregação foi analisada depois de 2 minutos da incubação com 5 µL das diferentes amostras (TLBbz e TLBro) na concentração da enzima 1 mg/ml dissolvida com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,8.

A determinação da agregação plaquetária foi realizada com solução de ADP (1 mg/mL) como controle positivo (agregante plaquetário); as enzimas TLBbz e TLBro (1 mg/mL), mais a mesma TLBbz e TLBro pré-incubado com PMSF (5 mM) (volume 1/1) como controle negativo.

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram representados pela média de experimentos \pm desvio padrão. A significância foi obtida através do teste não-pareado *t*-Student e considerada como $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1 Purificação de uma fração com atividade trombina-símile isolada a partir de veneno total de *Bothrops brazili* e *B. roedingeri* em HPLC de fase reversa.

A figura 9 mostra o perfil cromatográfico do veneno total *Bothrops brazili* feito em uma coluna analítica μ -Bondapak C-18 (Waters), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa. Foram detectados 21 picos. Estas frações, depois de serem liofilizadas, foram submetidas a ensaios de atividade proteolítica sobre o BApNA para detecção da fração de interesse com maior atividade enzimática. Da mesma forma foram realizados com estas frações ensaios de tempo de coagulação sobre fibrinogênio bovino com o propósito da identificação da serinoprotease. Os resultados evidenciaram que a fração 12 denominada de TLBbz foi a que apresentou atividade enzimática serinoprotease com característica trombina-símile. Essa fração foi eluída no tempo de retenção aos 37 ± 0.5 min, sendo aos 65 % do tampão B.

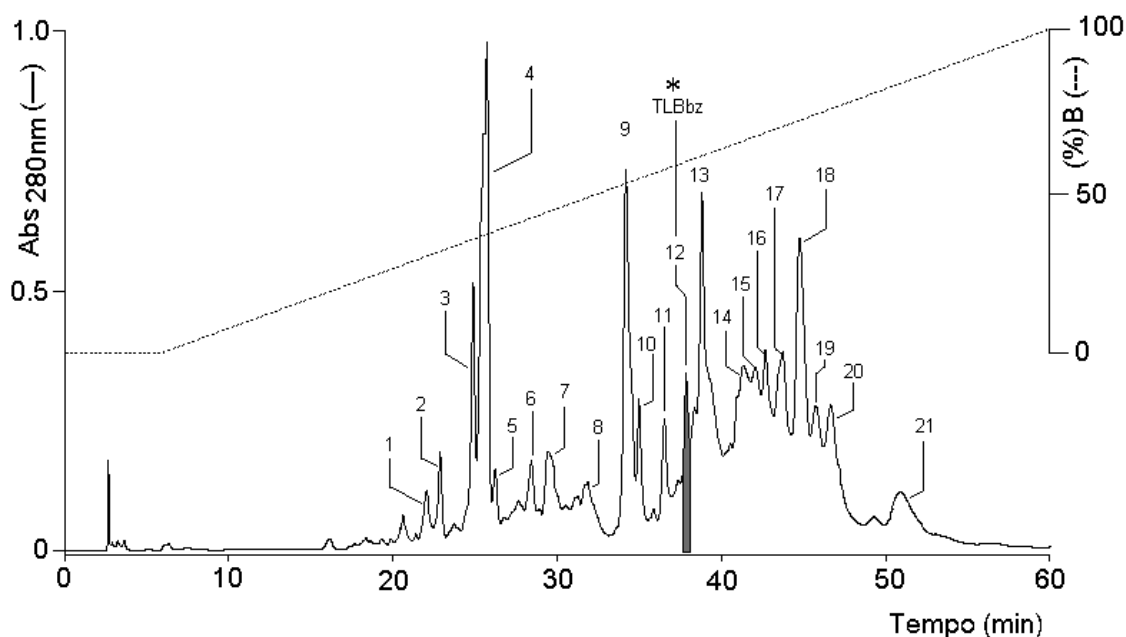


Figura 9. Cromatografia em sistema HPLC-fase reversa em uma coluna analítica C-18 μ -Bondapak (Waters), equilibrada em solução de TFA (ácido trifluoroacético 0,1 % pH 3,5 solvente A). 5 mg de veneno total foi aplicado em cada corrida. A proteína TLBbz (* fração 12) foi eluída usando um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 66 %, TFA 0,1 %). O perfil cromatográfico foi monitorado na absorbância de 280 nm. As frações foram eluídas em um fluxo constante de 1 mL/min. Gráfico representativo de 20 corridas cromatográficas.

Da mesma forma que o passo anterior de purificação a figura 10 mostra o perfil cromatográfico do veneno total *Bothrops roedingeri* feito na mesma coluna analítica μ -Bondapak C-18 (Waters), acoplada a um sistema de HPLC de fase reversa. Foram detectados 17 picos. Estas frações depois de serem liofilizadas, também foram submetidas a ensaios de atividade proteolítica sobre o BApNA para detecção da fração de interesse com atividade enzimática, assim como também, foram realizados ensaios de tempo de coagulação sobre fibrinogênio bovino com o propósito da identificação da serinoprotease. A fração 12 denominada de TLBro foi a que apresentou atividade enzimática serinoprotease com característica trombina-símile. Essa fração foi eluída no tempo de retenção aos 38 ± 0.5 min, sendo aos 68 % do tampão B.

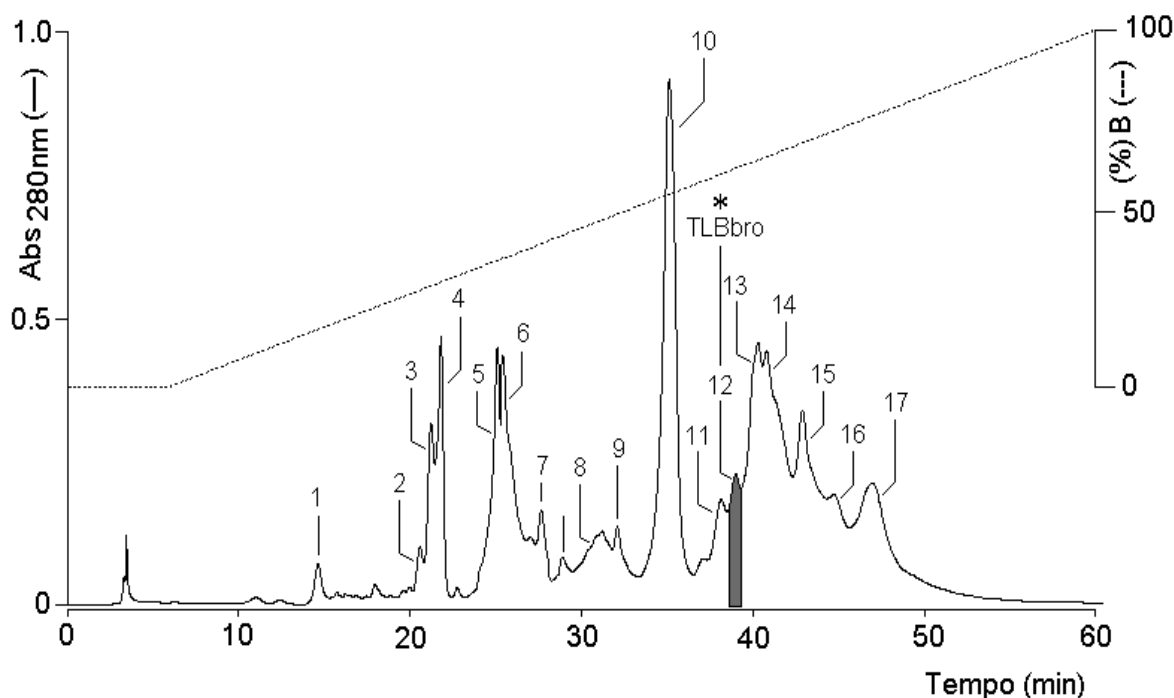


Figura 10. Cromatografia em sistema HPLC-fase reversa em uma coluna analítica C-18 μ -Bondapak (Waters), equilibrada em solução de TFA (ácido trifluoroacético 0,1 % pH 3,5 solvente A). 5 mg de veneno total foi aplicado em cada corrida. A proteína TLBro (* fração 12) foi eluída usando um gradiente linear contínuo de concentração do tampão B (Acetonitrila 66 %, TFA 0,1 %). O perfil cromatográfico foi monitorado na absorbância de 280 nm. As frações foram eluídas em um fluxo constante de 1 mL/min. Gráfico representativo de 20 corridas cromatográficas.

4.2 Atividade proteolítica da trombina-símile TLBbz e TLBro

O substrato cromogênico DL-BAPNA foi usado em uma solução 0,1 M para dosagem das frações TLBbz e TLBro (1 mg/mL); 5 µL da amostra foram colocados em um meio de incubação que contém 235 µL de uma solução de substrato previamente dissolvido em DMSO como solução estoque para ser utilizado na proporção de 1/10 (10 µL) em tampão Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8 para um volume final de 240 µL.

Os resultados da atividade proteolítica evidenciam que a fração 12 (TLBbz) obtida do HPLC-FR foi a única que mostrou atividade catalítica dentre as 21 frações coletadas frente ao substrato cromogênico DL-BAPNA, com uma velocidade de reação de $2,14 \pm 0,025$ nmoles/min que sugere a presença de uma serinoprotease (Figura 11).

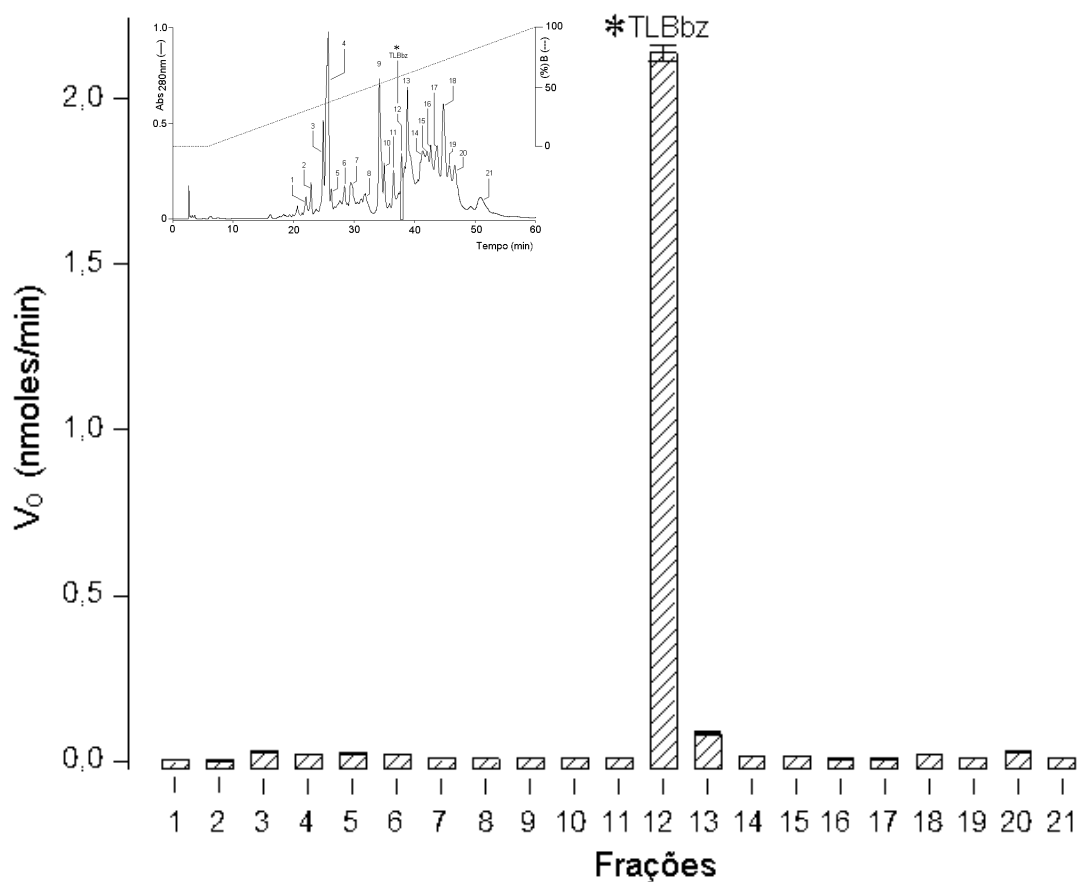


Figura 11. Determinação do perfil da atividade proteolítica das frações obtidas da cromatografia do veneno total de *B. brazili* em Cromatografia HPLC-fase reversa. O perfil da atividade proteolítica foi monitorado na absorbância de 405 nm. (*) serinoprotease TLBbz (Proteína que será considerada nas caracterizações bioquímicas e biológicas). Os ensaios da atividade proteolítica foram feitos em triplicata (n=3).

A figura 12 mostra a atividade proteolítica avaliada nas frações obtidas da cromatografia de HPLC-FR do veneno de *B. roedingeri*.

O perfil da atividade proteolítica frente ao substrato cromogênico DL-BAPNA evidencia que a fração 12 foi a que apresentou maior atividade proteolítica de $0,43 \pm 0,043$ nmoles/min, evidenciando a presença de uma serinoprotease nessa fração.

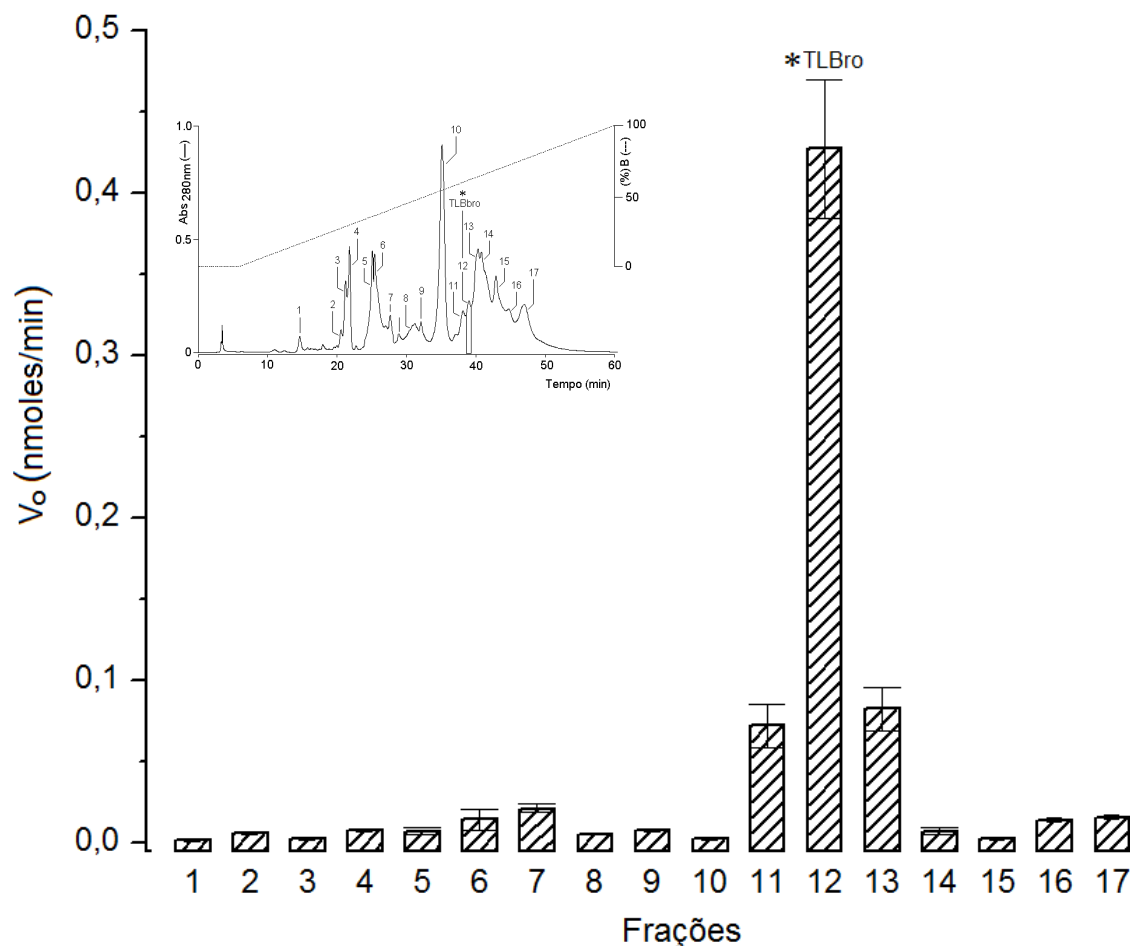


Figura 12. Determinação do perfil da atividade proteolítica das frações obtidas da cromatografia do veneno total de *B. roedingeri* em Cromatografia HPLC-fase reversa. O perfil da atividade proteolítica foi monitorado na absorvância de 405 nm. (*) serinoprotease TLBro (Proteína que será considerada nas caracterizações bioquímicas e biológicas). Os ensaios da atividade proteolítica foram feitos em triplicata ($n = 3$).

4.3 Determinação da massa molecular das frações TLBbz e TLBro por SDS-PAGE

O gel de eletroforese evidencia a homogeneidade da proteína, mostrando uma banda tanto em condições reduzidas e não reduzidas (figura 13). As massas moleculares relativas da TLBbz e TLBro foram obtidas baseada na figura 13 calculando as distancias percorridas de cada marcador molecular e as proteínas TLBbz e TLBro em condições reduzidas e não reduzidas (figura 14).

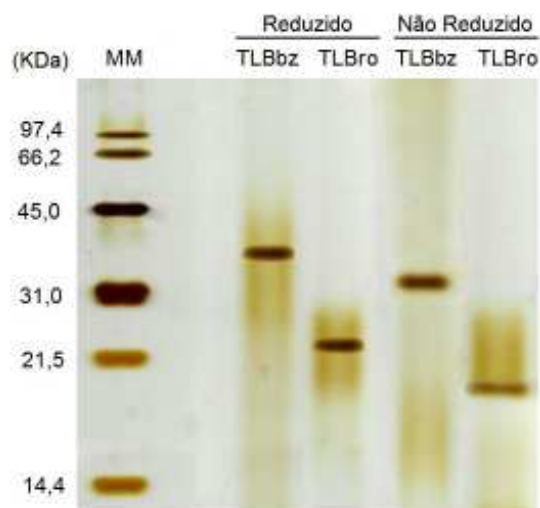


Figura 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas e na presença de agente desnaturante (DTT). Marcadores moleculares (MM). TLBbz e TLBro obtidas do HPLC em condições não reduzidas e reduzidas com DTT.

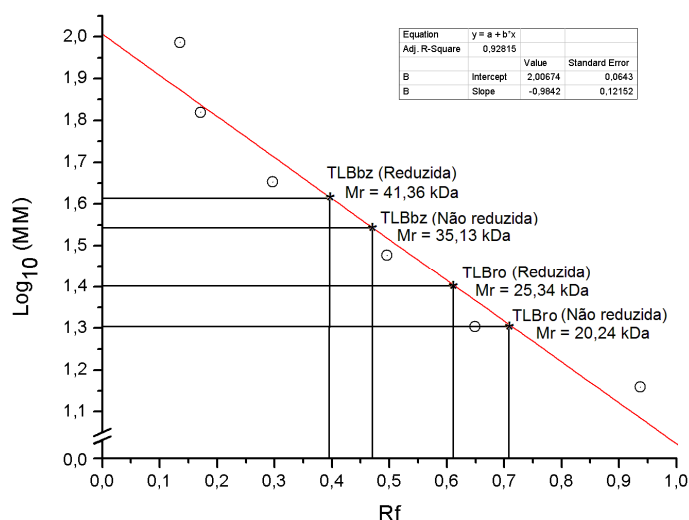


Figura. 14. Curva gerada através da representação gráfica do logaritmo dos marcadores da massa molecular standard contra a mobilidade relativa (Rf) para obter a massa molecular relativa da TLBbz e TLBro em condições reduzidas e não reduzidas. Rf= mobilidade relativa. Rf = distância migrada pela proteína / distância migrada pela coloração.

4.4 Determinação das sequências de peptídeos da fração TLBbz purificada de *Bothrops brazili*.

A TLBbz foi digerida com tripsina e alguns peptídeos trípticos foram separados por HPLC-FR, detectados e caracterizados, sendo as massas moleculares medidas e as sequências de aminoácidos deduzidas obtidas por ESI-QTOF-MS/MS baseadas nos peptídeos trípticos alquilados de TLBbz (Tabela 1). Todas as massas moleculares foram informadas como monoisotópicas.

Tabela 1. Massas moleculares medidas e sequências de aminoácido deduzidas de peptídeos trípticos obtidas da proteína TLBbz alquilada.

Fração de HPLC	TLBbz		
	Massa Medida (Da)	Sequência de Aminoácidos	Massa Teórico (Da)
1	1511.6787	VI/LGGDECNI/LNEHR	1511.5957
2	1068.5968	FL/IVAL/IYTSR	1068.5952
3	1419.7002	SL/IMNI/LYLGMHMK	1419.7044
4	964.4362	FDDEQ/KRR	964.4110
5	753.4609	L/INRPVR	753.4270
6	1188.6325	WDK/QDI/LMLI/LR	1188.6304
7	1189.6165	I/LMGWGTI/LSPTK	1189.6163
8	1060.5587	TL/ICAGI/LLEGGK	1059.5728
9	1167.5560	VSDYTEWI/LR	1167.5544
10	1732.8118	VLCAGVLEGGIDTCNR	1732.8237

4.5 Determinação do peptídeo crucial por espectrometria de massa (ESI-QTOF-MS/MS)

O peptídeo tríptico crucial que confirma a região N-terminal, característica da família das serinoproteases com atividade trombina-símile de veneno de serpente, é mostrado na fração 1 da enzima TLBbz, tendo as sequências de aminoácidos deduzidas que são: “1511.6787 Da” (espectro de massa M/S em tandem na Figura 15).

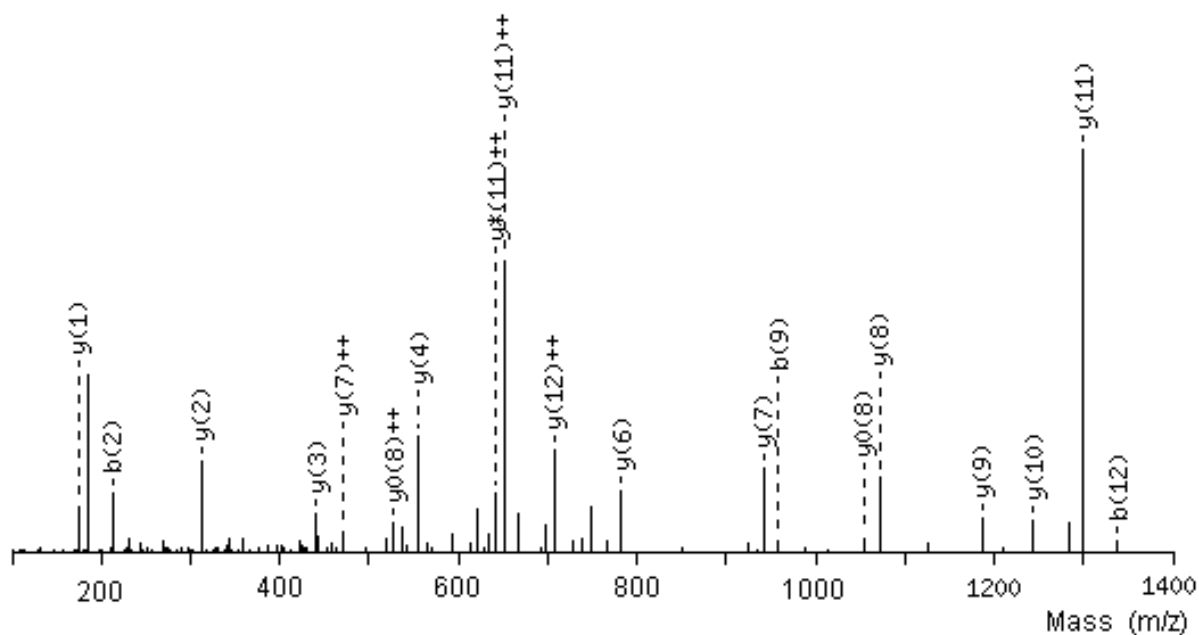


Figura 15. Espectros ESI-QTOF-MS/MS dos peptídeos trípticos (1) com uma massa de 1511.6787 Da. Série de fragmento de íons b do peptídeo tríptico de 9-resíduo-longo na fração 1 do HPLC-FR da TLBbz.

4.6 Análise da homologia sequencial da trombina-símile TLBbz

A sequência de aminoácidos da TLBbz foi deduzida utilizando o banco de dados NCBI-BLAST. TLBbz possui um alto grau de similaridade (Figura 16) com P33589 *Lachesis muta muta* (Magalhaes *et al.*, 1993), O73800_1 *Gloydus halys* (Jeong *et al.*, 2001), P85109 *Gloydus brevicaudus* (Sakai *et al.*, 2006), Q8AY81_1 *Viridovipera stejnegeri* (Zhang *et al.*, 1998).

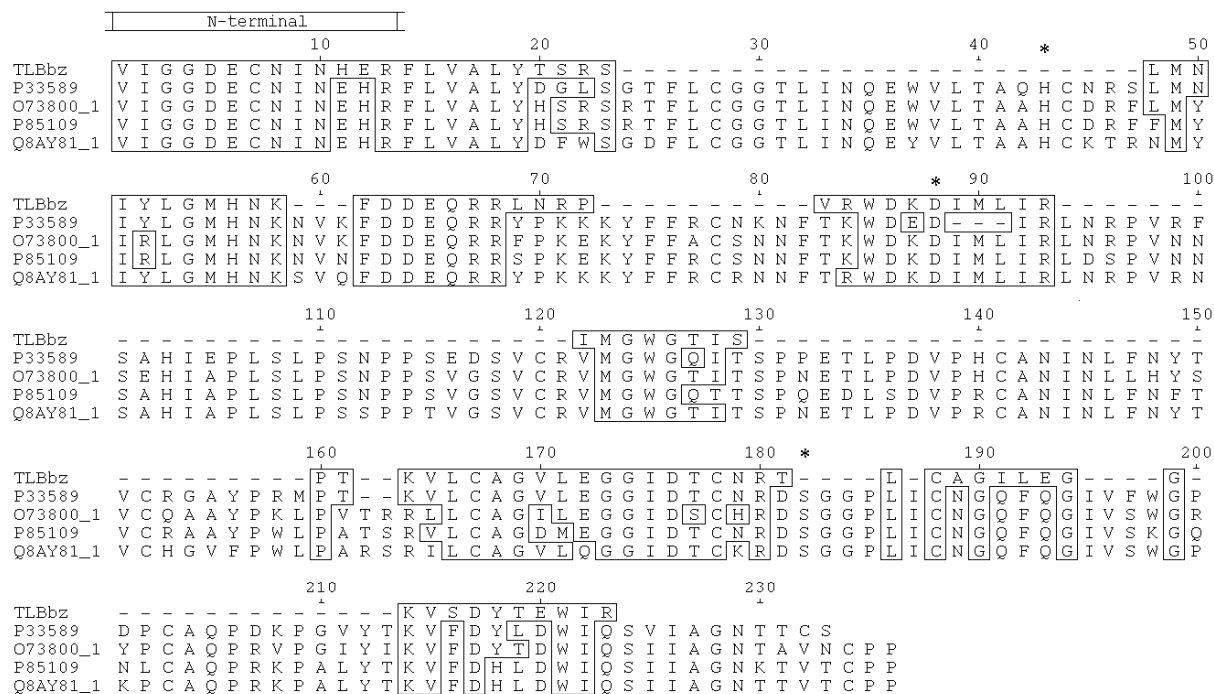


Figura 16. Análise comparativa da sequência de aminoácidos da trombina-símile de *Bothrops brazili* (TLBbz) com outras serinoproteases semelhantes obtidas da base de dados BLAST-Protein Data Bank (Pubmed. Medline) onde o símbolo (*) representa os aminoácidos que compõem o sítio catalítico desta classe de enzimas.

4.7 Determinação das sequências de peptídeos da fração TLBro purificada de *Bothrops roedingeri*

A TLBro foi digerida com tripsina e alguns peptídeos trípticos foram separados por HPLC-FR, detectados e caracterizados, sendo as massas moleculares medidas e sequências de aminoácido deduzidas obtidas por ESI-QTOF-MS/MS baseadas nos peptídeos trípticos alquilados de TLBro (Tabela 2). Todas as massas moleculares foram informadas como monoisotópicas.

Tabela 2. Massas moleculares medidas e sequências de aminoácidos deduzidas de peptídeos trípticos obtidas da proteína TLBro alquilada.

Fração de HPLC	TLBro		
	Massa Medida (Da)	Sequência de Aminoácidos	Massa Teórico (Da)
1	1454.6572	VI/LGGDECNI/LNEHR	1454.6594
2	1287.6394	NFQ/KMQ/KL/IGVHSK	1286.6335
3	1230.6204	KVL/INEDEQ/KTR	1229.6193
4	848.4578	FI/LCPNKK	848.4591
5	1188.6325	WDK/QDI/LMLI/LR	1187.6455
6	1258.5652	ETYPDVPHCAK	1258.5631
7	1076.5614	AAYAGL/IPATSR	1076.5619
8	1139.5499	VSDYTEWI/LK	1139.1515

4.8 Determinação do peptídeo crucial por espectrometria de massa (ESI-QTOF-MS/MS)

O peptídeo tríptico crucial que confirma a região N-terminal, característica da família das serinoproteases com atividade trombina-símile de veneno de serpente é mostrada na fração 1 da enzima TLBro, tendo as sequências de aminoácidos deduzidas que são: “1454.6572 Da” (espectro de massa M/S em tandem na Figura 17).

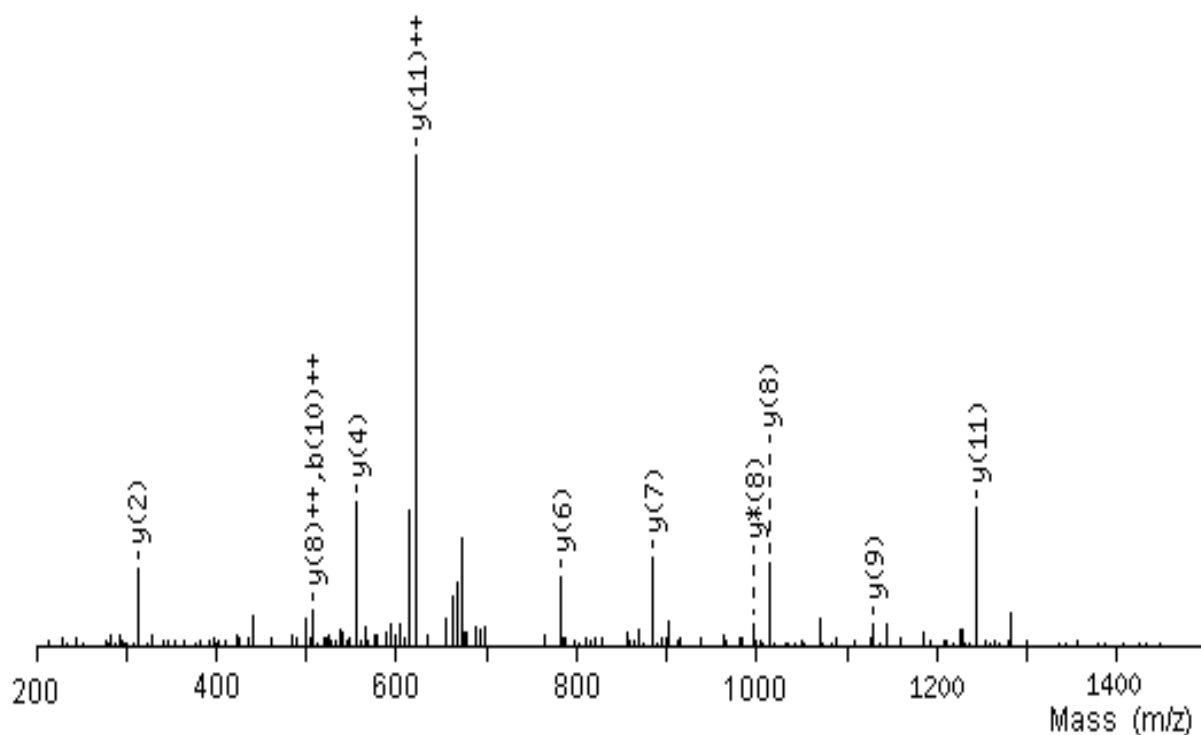


Figura 17. Espectro ESI-QTOF-MS/MS dos peptídeos trípticos (1) com uma massa de 1454.6572 Da. Série de fragmento de íons b do peptídeo tríptico de 9-resíduo-longo na fração 1 do HPLC-FR da TLBro.

4.9 Estudos das atividades cinéticas das Trombinas-símile TLBbz e TLBro.

A medida da atividade enzimática proteolítica foi determinada nas condições de ensaio descritas no método 4.2 utilizando o substrato cromogênico sintético DL-BApNA.

4.9.1 Efeito da concentração do substrato

Os resultados do efeito da concentração de substrato na atividade proteolítica frente ao substrato cromogênico DL-BApNA nessas condições experimentais mostram que a trombina-símile TLBbz e TLBro apresentam um comportamento michaeliano conforme ilustrado na figura 19.

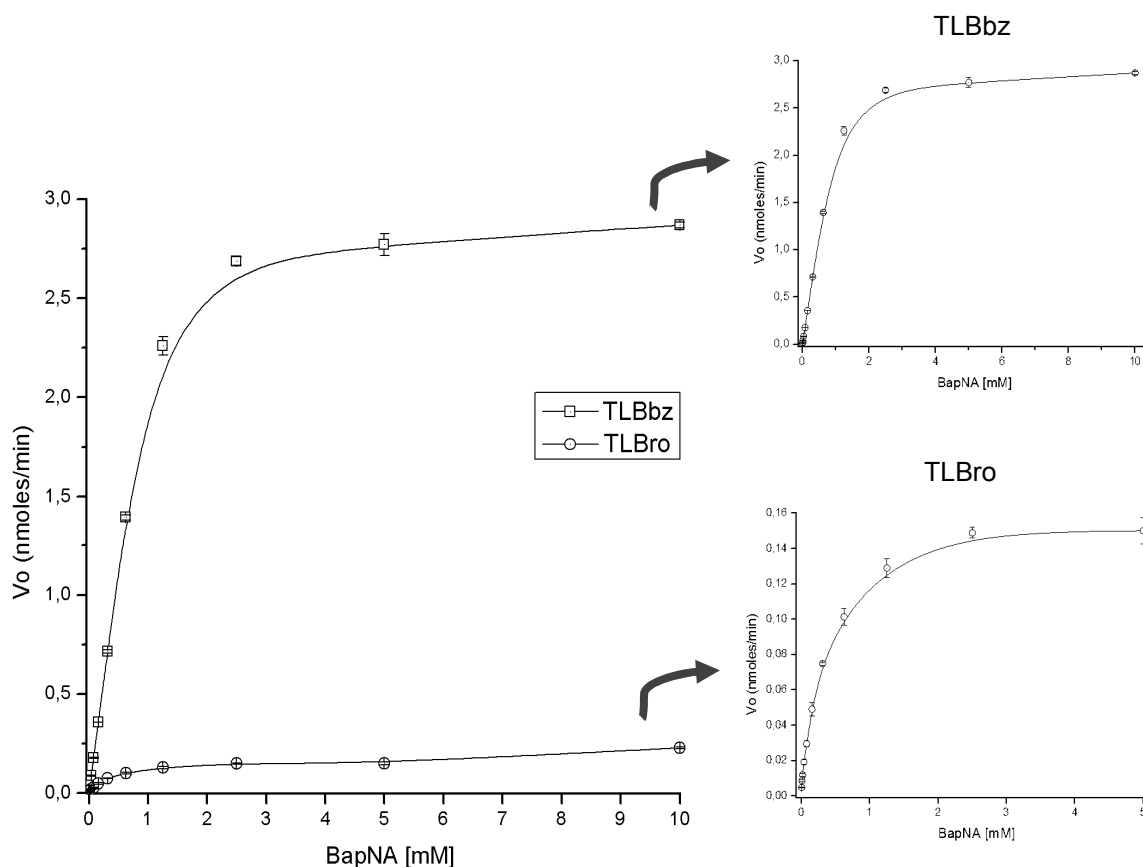


Figura 19. Efeito da concentração do substrato na atividade proteolítica da trombina-símile TLBbz e TLBro. As proteínas foram incubadas na presença de diferentes concentrações de substrato (0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mM de BApNA) por 40 minutos a 37 °C. A leitura de absorvância foi monitorada em 405 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação (V_o) e foi calculada baseada na p-nitroanilida liberada após catálise. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

Na análise da re-gráfica empregando o método de Lineweaver-Burk (duplos recíprocos), foi possível calcular as constantes cinéticas K_M e V_{max} . Assim, os valores obtidos foram: $V_{max} = 1,89$ nmoles p-NA/Lt/min e $K_M = 0,853$ mM respectivamente, para a TLBbz; e $V_{max} = 0,0432$ nmoles p-NA/Lt/min e $K_M = 0,039$ mM respectivamente para a TLBro tal como se pode observar na figura 20A e 20B.

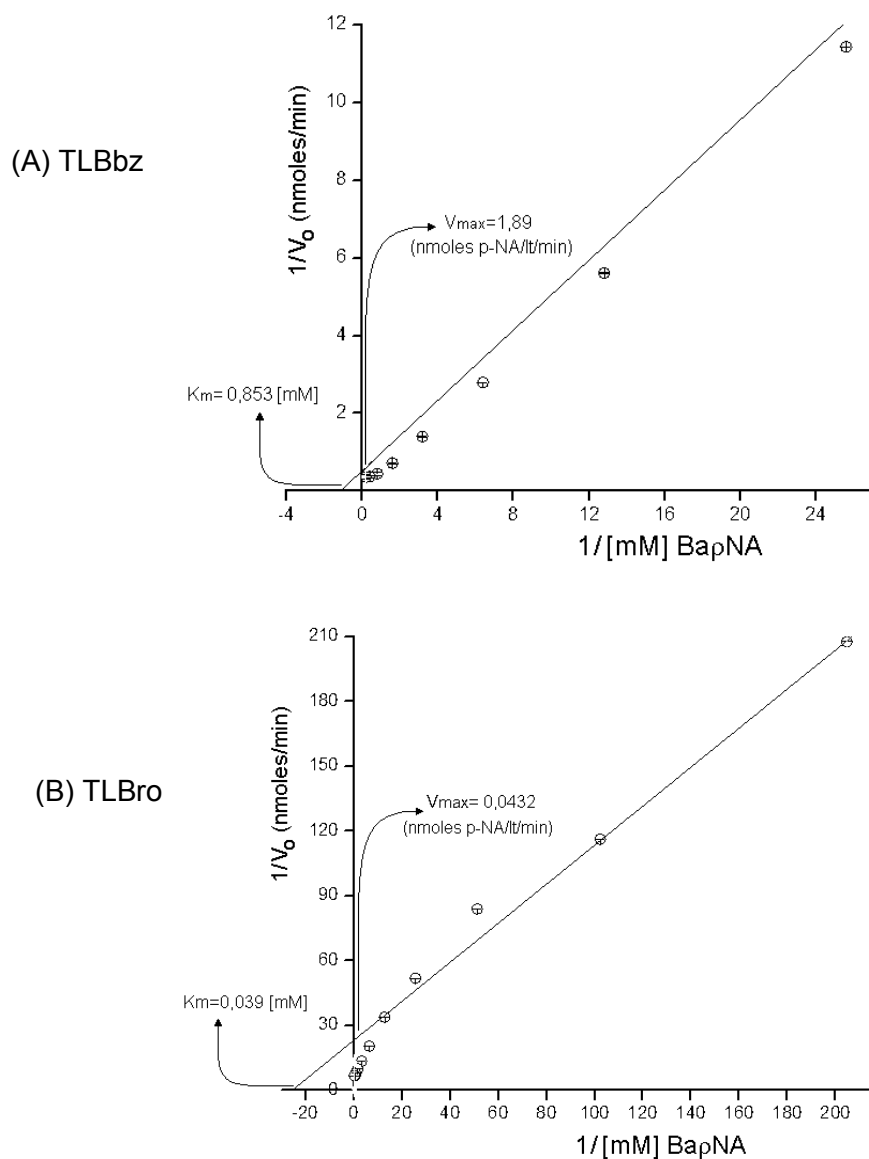


Figura 20. Efeito da concentração do substrato na atividade proteolítica da trombina-símile TLBbz e TLBro empregando o método de Lineweaver-Burk (duplos recíprocos). Os valores encontrados para as constantes cinéticas de V_{max} e K_M foram calculados estabelecendo o grau de regressão e correlação (linearidade da reta), entre os inversos da velocidade ($1/V_{max}$) e os inversos ($1/K_M$) da concentração do substrato. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

4.9.2 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi determinado incubando a serinoprotease TLBbz e TLBro com atividade trombina-símile em diferentes temperaturas (15 – 70 °C). A atividade da enzima entre 40 até 70 °C foi considerada como ótima para a TLBbz e de 45 °C para a TLBro tal como se mostra na figura 21A e 21B.

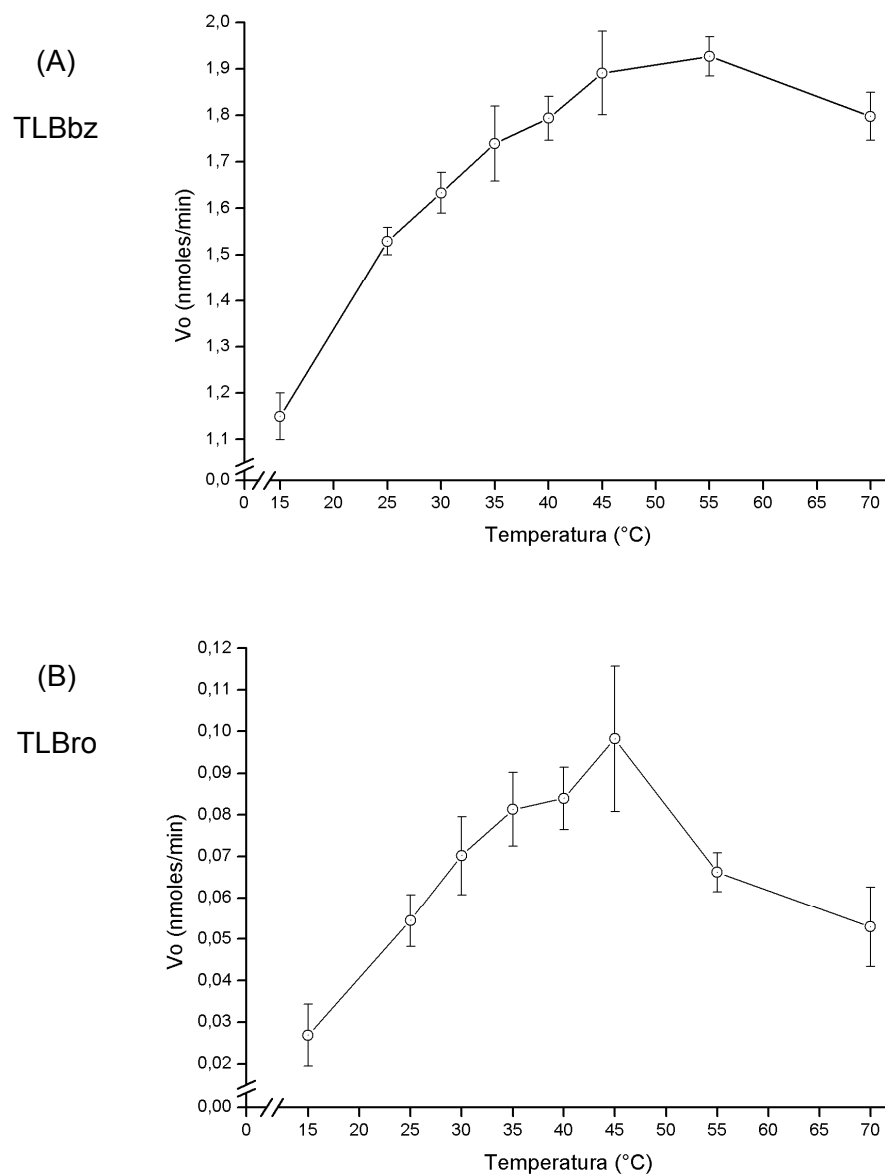


Figura 21. Efeito da variação de temperatura sobre a atividade proteolítica da trombina-símile TLBbz e TLBro. As faixas das temperaturas empregadas foram 15, 25, 30, 35, 40, 45, 55 e 70 °C. Depois de incubada durante 40 minutos, foi feita a leitura de absorbância monitorada em 405 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação (V_o), e foi calculada baseada na p -nitroanilina liberada após a catálise. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

4.9.3 Efeito do pH na atividade proteolítica da trombina-símile TLBbz e TLBro

O pH ótimo das serinoproteases TLBbz e TLBro, foi determinado incubando as enzimas em diferentes pH (2 – 10) sendo feito um controle para cada pH. A atividade da enzima em pH 8 a 10 foi considerada como ótimo para a TLBbz, já que não cai a pH superior de 8 ate 10 mostrando estabilidade considerável, mesmo com o aumento do pH, e para a TLBro o pH 8 foi considerado como ótimo, mas conforme o pH aumenta ou diminui deste valor, a atividade enzimática decresce drasticamente, tal como se mostra na figura 22.

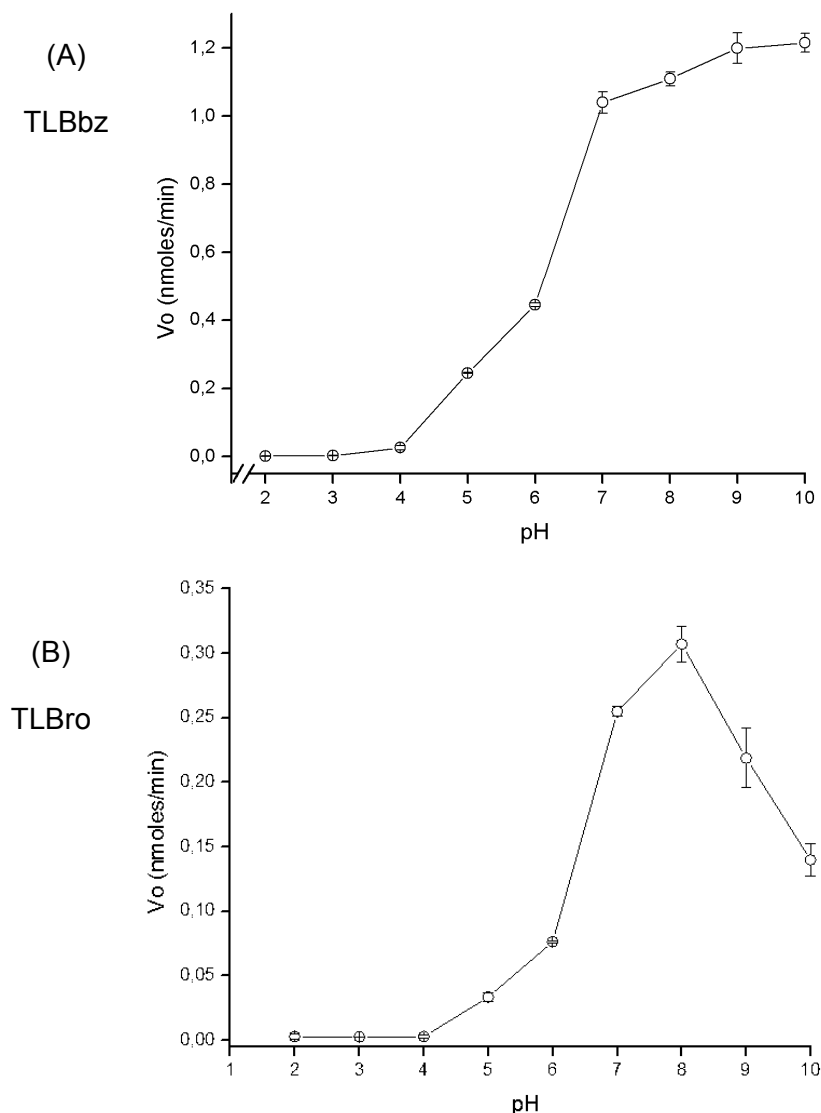


Figura 22. Efeito do pH na atividade proteolítica da trombina-símile TLBbz e TLBro. Os âmbitos de pH empregados foram: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, perante o substrato DL- BApNA. A enzima foi incubada durante 40 minutos a 37 °C e a leitura da absorbância foi monitorada em 405 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação (V_o) e foi calculada baseada na p -nitroanilida liberada após a catálise. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão.

4.9.4 Efeito inibitório da atividade proteolítica

Foi estudado o efeito inibitório de EDTA (5 mM), SBTI (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), soro de *Didelphis marsupialis* (1 mg/mL) e PMSF (5 mM) na atividade proteolítica das serinoproteases com atividade trombina-símile TLBbz e TLBro.

Os resultados mostram claro efeito inibitório do PMSF sobre a atividade proteolítica da serinoprotease TLBbz (86,2 %) e da TLBro (42,6 %), o que evidencia o caráter serinoprotease da proteína, ao ser inibida significativamente a atividade proteolítica perante o substrato cromogênico DL-BApNA. Com os demais inibidores a faixa de inibição foi de 30 até 40 % para as duas enzimas conforme na Figura 23A e 23B.

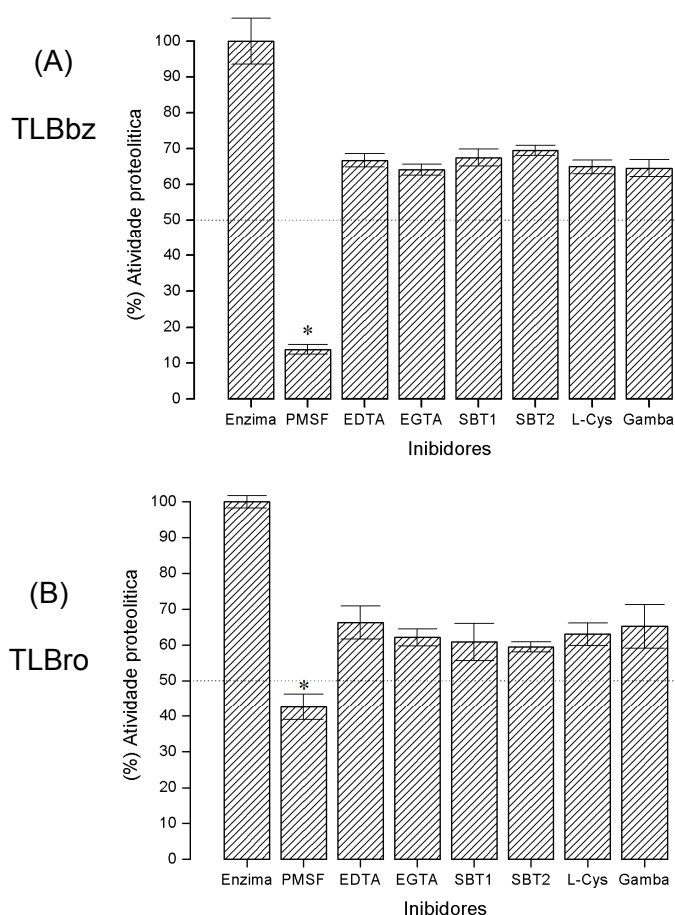


Figura 23. Efeito inibitório da atividade proteolítica da trombina-símile TLBbz e TLBro frente a PMSF, EDTA, EGTA, SBT1, SBT2 L-Cys e soro de *Didelphis marsupialis* (Gamba), frente ao substrato DL-BApNA. As enzimas foram incubadas na presença ou ausência de inibidores por 40 minutos a 37 °C e a leitura de absorbância foi monitorada em 405 nm. A atividade é expressa como porcentagem da velocidade de reação (%), e foi calculada baseada na p-nitroanilina liberada após a catálise. (*) Nível de significância das concentrações em relação ao controle. (n=3, $p<0,05$).

4.9.5 Efeito dos íons sobre a atividade proteolítica

A atividade proteolítica da serinoprotease TLBbz e TLBro foi avaliada com diferentes soluções de íons divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} (10 mM). A Figura 24 mostra que a atividade enzimática da TLBbz foi reduzida frente aos íons Zn^{2+} e Cd^{2+} , em comparação com a TLBro que foi reduzida a atividade frente aos íons Mg^{2+} e Cd^{2+} em comparação com os outros íons tal como se mostra na figura 24A e 24B.

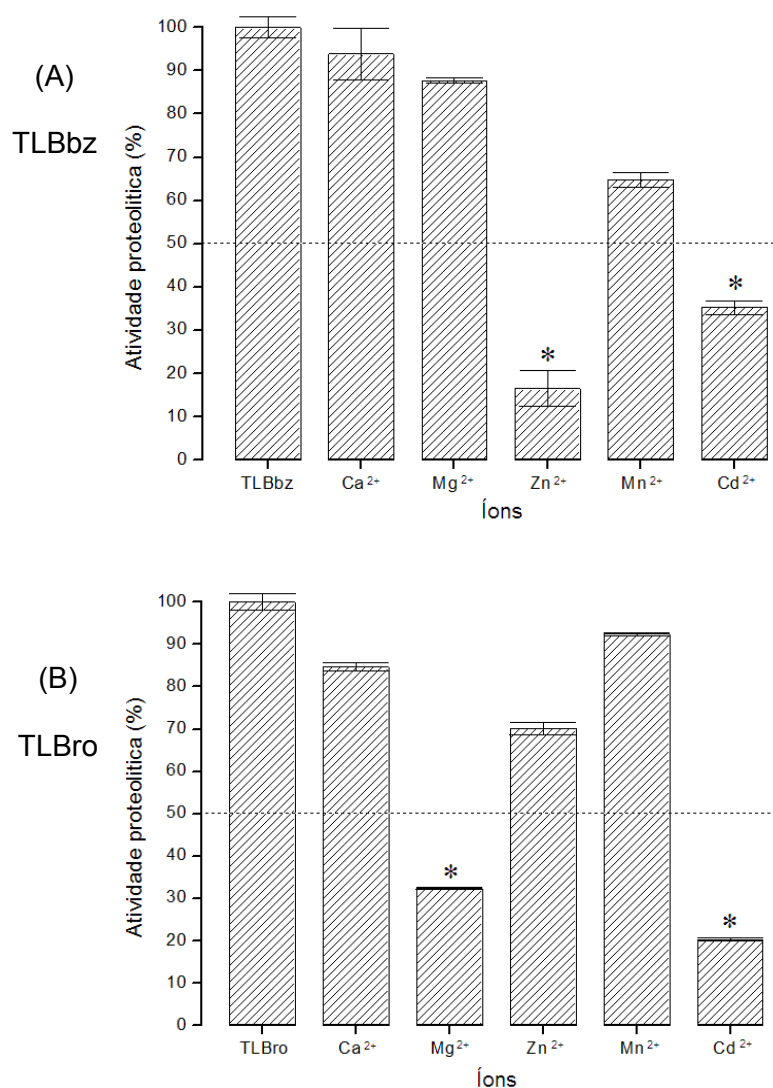


Figura 24. Efeito dos íons divalentes na atividade proteolítica da TLBbz e TLBro utilizando o substrato cromogênico DL-BApNA. As enzimas foram incubadas, na ausência ou presença de cátions divalentes, por 40 minutos a 37 °C e a leitura de absorbância foi monitorada em 405 nm. A atividade é expressa como a velocidade de reação baseada na p-nitroanilida liberada após a catálise. (*) Nível de significância das concentrações em relação ao controle. (n=3, $p<0,05$).

4.10 Análise de Composição de Aminoácidos (Pico-Tag) Waters.

A análise de composição de aminoácidos das trombina-símile TLBbz e TLBro (Tabela 3), mostra que trata-se de proteínas de caráter ácido pela predominância de Glx/21 e Asx/33 para TLBbz e Glx/14 e Asx/25 para TLBro. As 12 cisteínas detectadas nas duas enzimas, evidenciam a possível presença de 6 pontes dissulfeto, característica molecular desta família de proteínas. É evidenciada também, uma elevada porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos, tais como Gly, Pro, Leu e Ile e um baixo conteúdo de aminoácidos básicos (His, Arg e Lys) nas duas trombinas-símile. Todas estas características sugerem que a TLBbz e TLBro são serinoproteases.

Tabela 3. Composição de aminoácidos da trombina-símile TLBbz e TLBro isoladas do veneno de *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri*. Os valores são expressos em mol de aminoácidos por mol de proteína. (*) Não determinado pelo método.

<i>Aminoácido</i>	TLBbz	MM Calculado	%	TLBro	MM Calculado	%
Asx	33	3798,63	10	25	2877,75	14
Glx	21	2711,73	7	14	1807,82	8
Ser	27	2351,43	8	12	1045,08	6
Gly	33	1883,31	10	17	970,19	9
His	11	1508,76	3	4	548,64	2
Arg	14	2186,94	4	6	1093,47	4
Thr	28	3111,36	9	12	1333,44	6
Ala	22	1563,98	7	13	924,17	7
Pro	24	2331,12	8	14	1359,82	8
Tyr	10	1141,5	3	5	799,05	4
Val	18	2936,7	6	10	1631,5	5
Met	4	524,84	1	3	393,63	2
Cys	12	928,26	3	12	721,98	4
Ile	20	2063,4	6	9	928,53	5
Leu	25	2829,25	8	12	1358,04	7
Phe	7	1030,33	2	7	1030,33	4
Lys	12	1922,85	5	8	1281,9	5
Trp	*	*	*	*	*	*
Total	321	34842,39	100	183	20123,34	100

4.11 Caracterização farmacológica da serinoprotease com atividade trombina-símile TLBbz e TLBro procedentes de *B. brazili* e *B. roedingeri*.

4.11.1 Avaliação da atividade coagulante da trombina-símile TLBbz e TLBro

A atividade coagulante foi determinada medindo-se os inversos do tempo de coagulação ao primeiro sinal da formação da rede de fibrina a partir do fibrinogênio bovino e, por conseguinte, a formação do coágulo em diferentes tempos após a adição de 20 μ L da amostra sobre o substrato de fibrinogênio previamente incubado com CaCl_2 10 mM a 37 °C durante 10 minutos. O tempo máximo de espera para a formação da rede de fibrina das TLBbz e TLBro foi de 120 segundos a 37 °C.

As frações obtidas por HPLC de fase reversa com atividade proteolítica TLBbz e TLBro foram submetidas à atividade fibrinogenolítica cuja fração TLBro (fração 12) exibiu uma maior atividade fibrinogenolítica (7,75 segundos) enquanto, a fração TLBbz mostrou atividade fibrinogenolítica com segundos a mais no tempo da formação da rede de fibrina (10,5 segundos), alcançando o inverso de tempo de coagulação de 0.1304 s^{-1} (1/T.C) para a TLBro e de $0,096 \text{ s}^{-1}$ (1/T.C) para a TLBbz, como mostrado na figura 25.

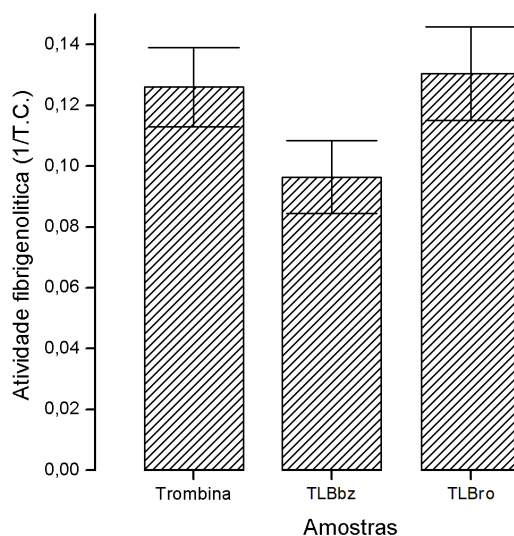


Figura 25. Determinação da atividade fibrinogenolítica utilizando fibrinogênio bovino. A concentração de solução de fibrinogênio empregado foi de 2 mg/mL (0,2 %). 20 μ g da fração TLBbz e TLBro isoladas foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7.4) e submetidas ao teste de coagulação. O tempo máximo de espera para a formação da rede de fibrina foi de dois minutos a 37 °C. A atividade coagulante foi determinada medindo-se os inversos do tempo de coagulação ao primeiro sinal da formação da rede de fibrina (n=3).

4.11.2 Degradação do fibrinogênio pela ação da trombina-símile (TLBbz e TLBro) e sua análise por SDS-PAGE

A atividade fibrinogenolítica foi avaliada de acordo com o método estabelecido por Ouyan e Teng (1976). 900 μ L da solução de fibrinogênio foi misturado com 100 μ L de solução salina e logo depois foram adicionados as serinoproteases TLBbz e TLBro (20 μ L) a cada ensaio separadamente por um período de 2 horas.

4.11.2.1 Efeito da concentração de enzima na degradação do fibrinogênio

A concentração de 20 μ g de TLBbz (Figura 26A) foi suficiente para começar a clivar a cadeia β com eficácia. A avaliação da concentração é dose dependente observado na aparição de bandas de massas moleculares relativas menores, que são proporcionais ao aumento da concentração da enzima. Como pode ser observado, os fibrinopeptídeos produtos da quebra da cadeia β do fibrinogênio através da atividade proteolítica são bem nítidos quando o ensaio é realizado utilizando uma concentração de 20 μ g de TLBz. Os resultados mostrados na figura 26B evidenciam que a fração TLBro possui atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, liberando fibrinopeptídeos α e β com concentração de 20 μ g; sendo que a cadeia β é clivada já com 2,5 μ g (Figura 26B).

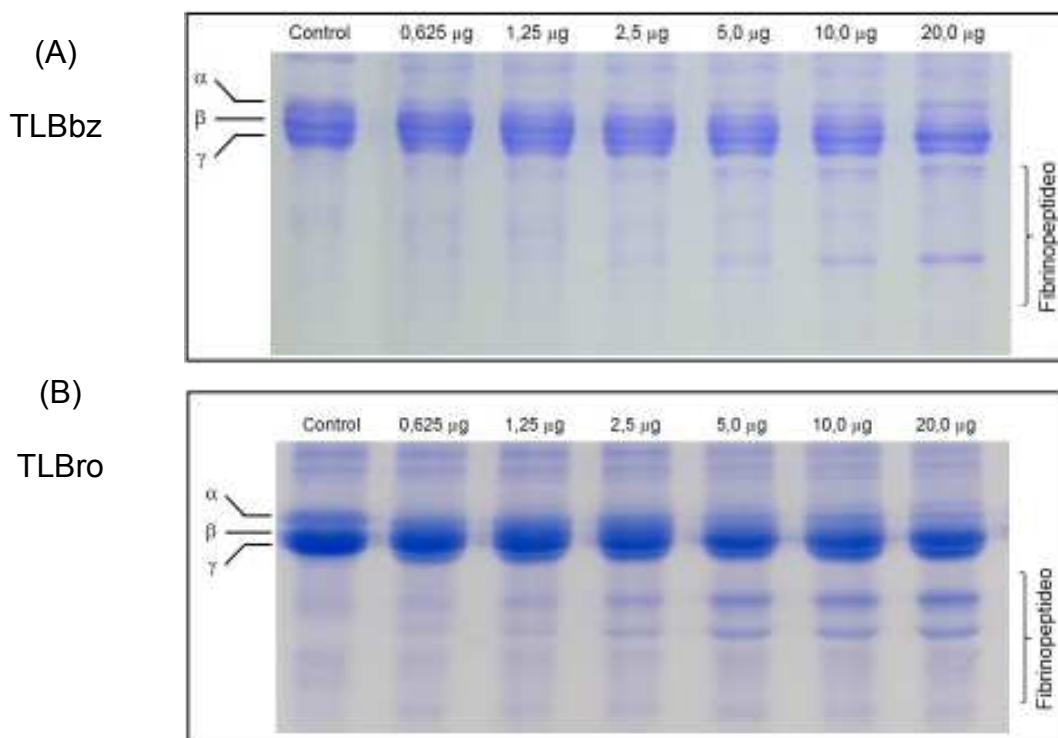


Figura 26. SDS-PAGE (12,5 %) Análise de degradação do fibrinogênio bovino por ação da TLBbz e TLBro em diferentes concentrações.

4.11.2.2 Efeito do tempo na degradação do fibrinogênio

As amostras, depois de serem incubadas por diferentes períodos de tempo, a saber, 0h, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h e 24h, tiveram as reações interrompidas com 100 μ L de uréia 8,5 M, β -Mercaptoetanol 10 %, SDS 2%; EDTA 2 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0.

Os produtos hidrolisados foram analisados por SDS-PAGE 12,5 %. As proteínas foram visualizadas por coloração com azul de Coomassie brilhante R-250 e o descoramento realizado com 25 % de etanol e 8 % de ácido acético em água.

Os resultados mostrados na figura 27A evidenciam que a trombina-símile TLBbz possui uma atividade trombina-símile capaz de degradar o fibrinopeptídeo beta (β) da molécula de fibrinogênio bovino. Assim, depois de 1 hora de incubação, a cadeia se mostra hidrolisada pela ação da trombina-símile.

Os resultados mostrados na Figura 27B claramente evidenciam que a TLBro possui atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, liberando fibrinopeptídeos A, às 2 horas e o fibrinopeptídeo B às 3 horas, pertencendo assim à família venombin AB. A concentração da enzima TLBro para cada ensaio foi de 20 μ g.

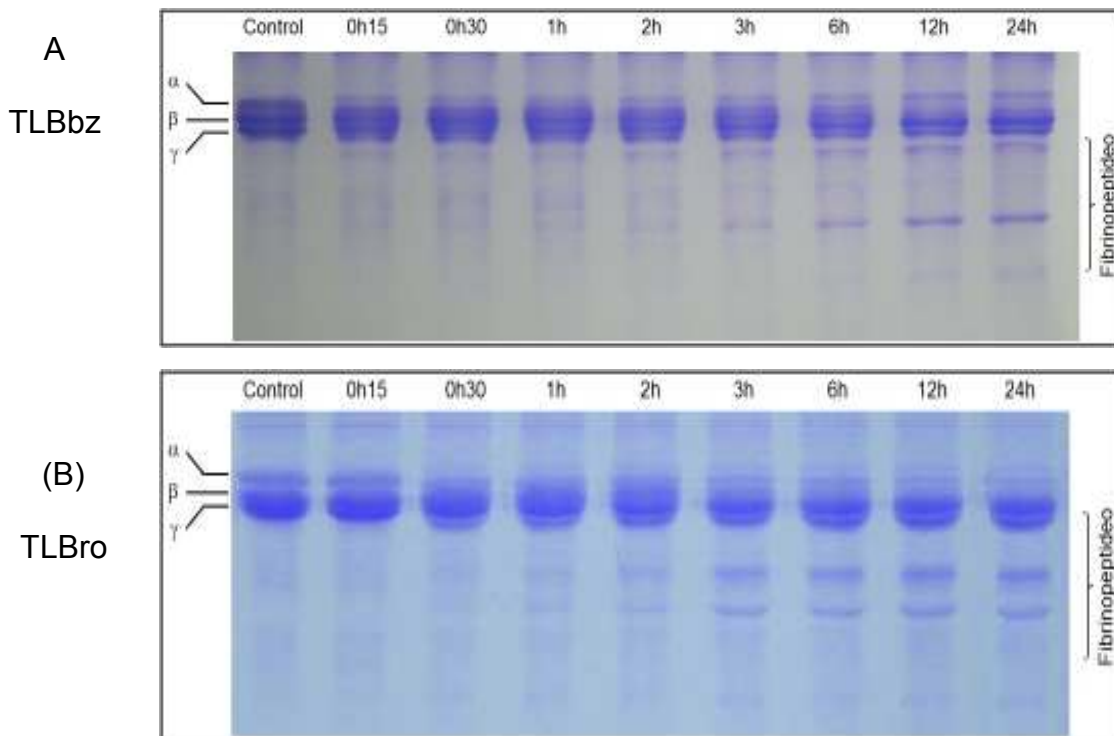
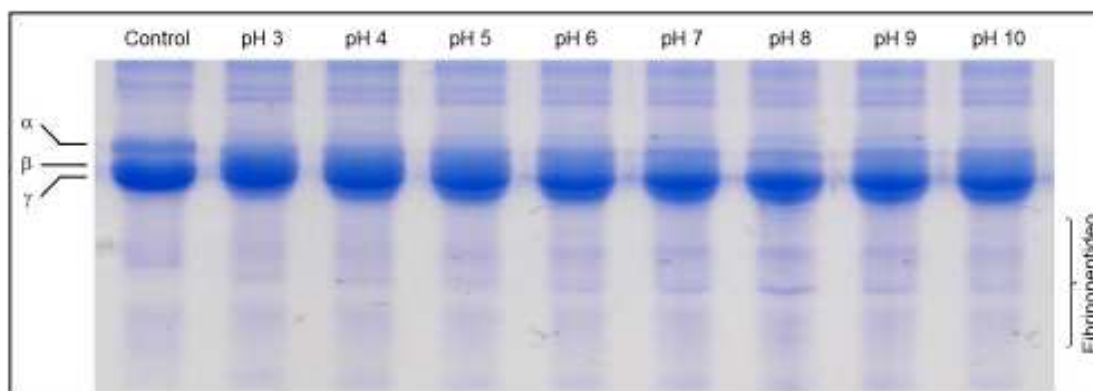


Figura 27. SDS-PAGE (12,5%). Análise de degradação de fibrinogênio bovino por ação de TLBbz e TLBro em diferentes tempos de incubação a 37 °C: 0h; 15 min; 30 min; 1h; 2h; 3h; 6h 12h e 24h. No controle tem-se a molécula de fibrinogênio aos 0 minutos da reação, mostrando a presença das cadeias α , β e γ da molécula de fibrinogênio.

4.11.2.3 Efeito do pH na degradação do fibrinogênio

Os resultados da figura 28A e 28B mostram o claro efeito do pH na atividade fibrinolítica, sendo que a pH de 8 a atividade foi máxima para ambas as enzimas (TLBbz e TLBro).

(A) TLBbz



(B) TLBro

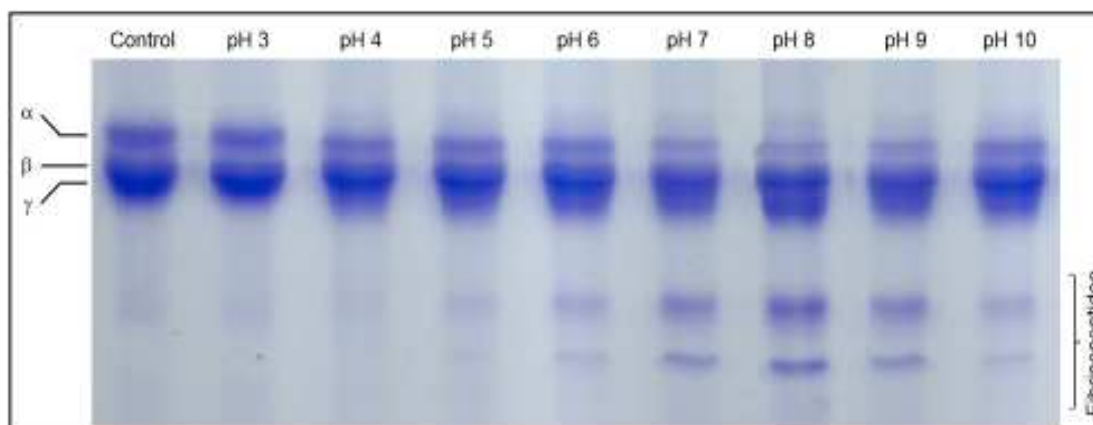
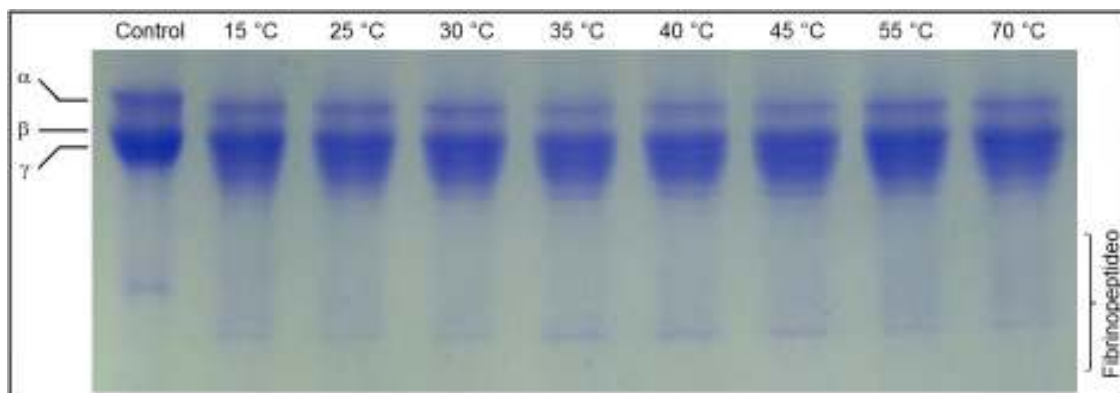


Figura 28. SDS-PAGE (12,5%) Análise de degradação do fibrinogênio bovino por ação da TLBbz e TLBro em diferentes pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 incubadas por duas horas.

4.11.2.4 Efeito da temperatura na degradação do fibrinogênio

A atividade fibrinolítica da TLBbz e TLBro foi avaliada em diferentes temperaturas de incubação, evidenciando que a quebra das cadeias do fibrinogênio é melhor entre 30 e 45 °C (Figura 29A e 29B).

(A) TLBbz



(B) TLBro

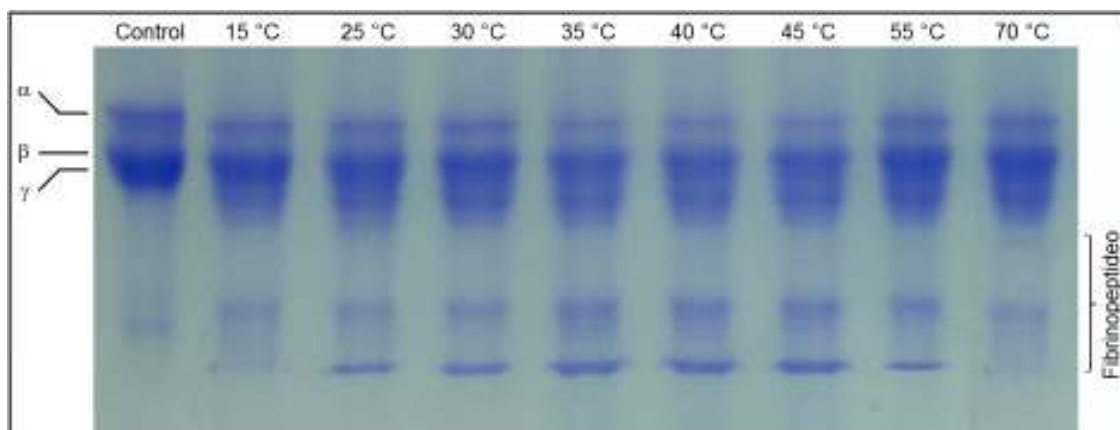
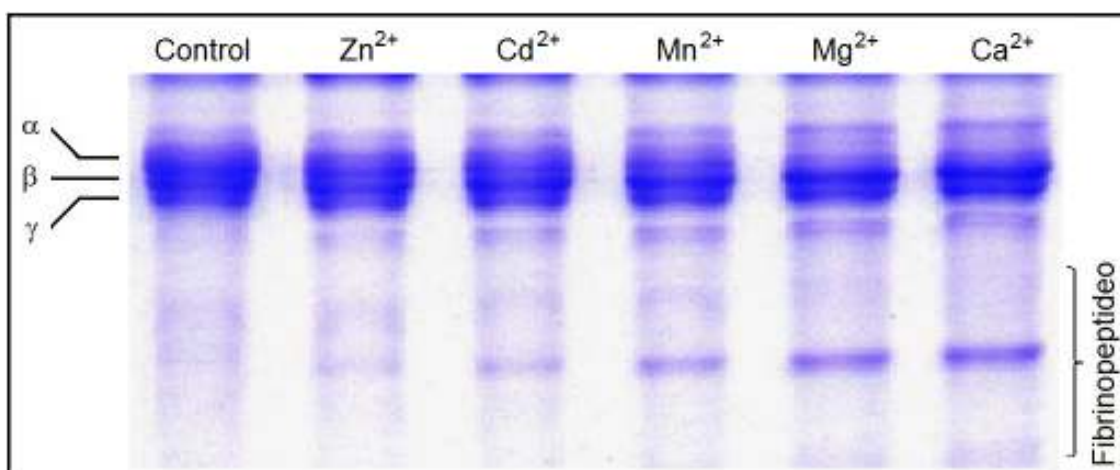


Figura 29. SDS-PAGE (12,5 %) Análise de degradação do fibrinogênio bovino por ação da TLBbz e TLBro em diferentes temperaturas. Como controle foi usado fibrinogênio bovino 2,0 mg/mL.

4.11.2.5 Efeito dos íons na degradação do fibrinogênio

A atividade fibrinogenolítica foi avaliada de maneira similar aos ensaios anteriores, entretanto com a presença de diferentes íons divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+}). Os resultados revelam que a atividade proteolítica de TLBbz e TLBro é aumentada na presença de íons cálcio, magnésio e manganês (Figura 30A e 30B).

(A) TLBbz



(B) TLBro

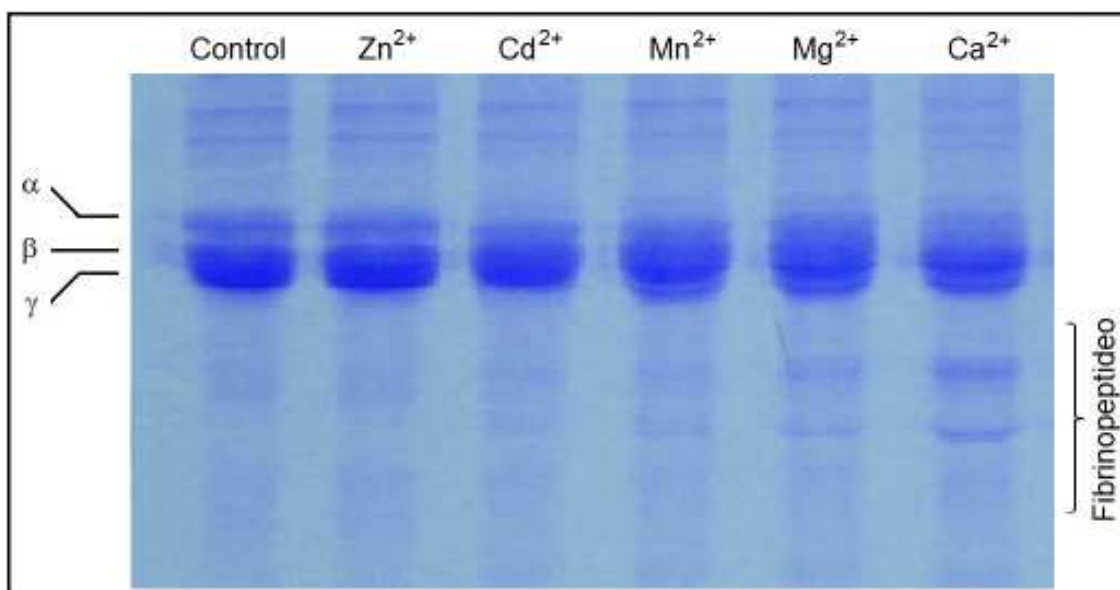


Figura 30. SDS-PAGE (12,5 %) Análise de degradação do fibrinogênio bovino por ação da TLBbz e TLBro com diferentes íons. Como controle foi usado fibrinogênio bovino 2,0 mg/ml.

4.11.3. Determinação da Agregação Plaquetária

O teste de agregação plaquetária realizado com a fração TLBbz e TLBro mostra que a proteína agrega plaquetas diretamente sendo esse processo inibido em presença de PMSF.

Inicialmente incubaram-se as plaquetas com ADP que resultaram na ativação da agregação plaquetária (controle positivo). Em uma segunda incubação foi adicionada as plaquetas com a fração TLBbz e após 6 minutos de leitura foi evidenciada a ativação da agregação plaquetária.

Depois foram incubadas as plaquetas com a fração TLBbz previamente incubadas com PMSF e observou-se a inibição da agregação plaquetária (controle negativo) de acordo com o mostrado na figura 31. O efeito inibitório da serinoprotease pela ação do PMSF foi evidenciado ao não mostrar a agregação das plaquetas. A TLBro também provocou a agregação plaquetaria quando se fez o ensaio sob mesmas condições que a TLBbz.

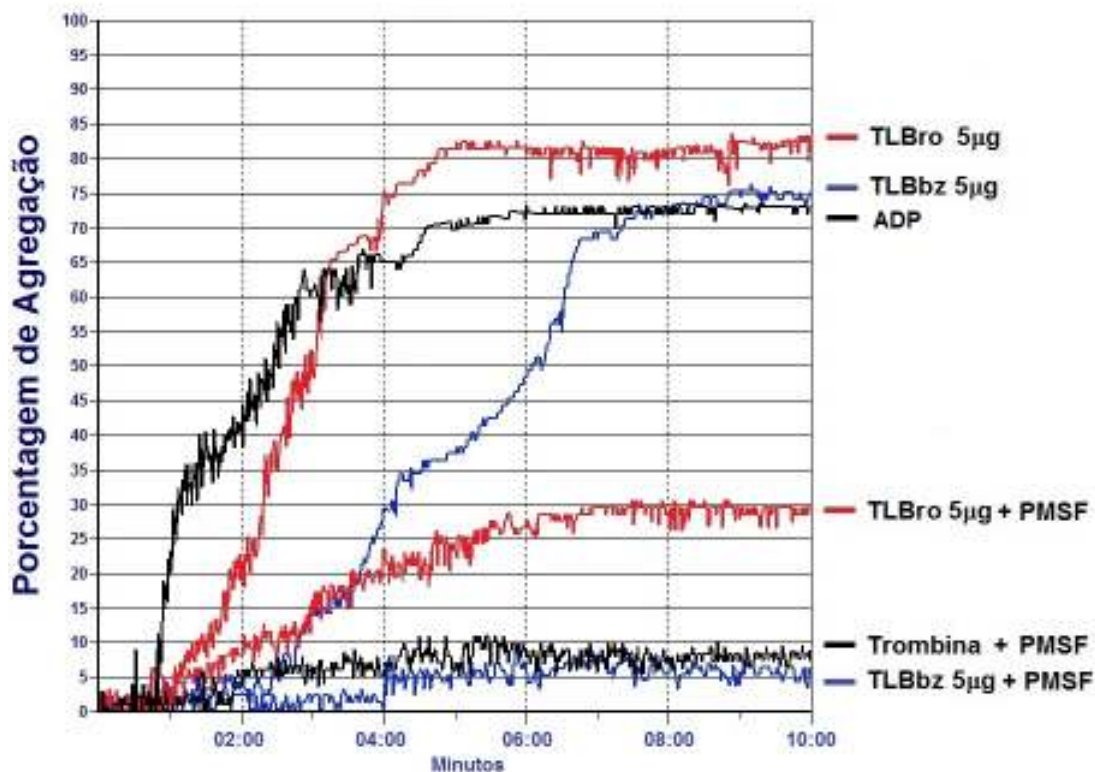


Figura 31. Representação gráfica da agregação plaquetária induzida pela serinoprotease com atividade Trombina-símile TLBbz e TLBro. O quadro mostra a presença do agregante ADP, onde se observa o processo da agregação plaquetária. O efeito da agregação plaquetária é evidenciado pela presença da serinoprotease TLBbz e TLBro (1 mg/mL).

V. DISCUSSÃO

A purificação de moléculas presentes nos venenos de serpentes exige critérios e técnicas padronizadas de manipulação. A amostra final deve ter qualidade, ou seja, grau de pureza, além de manter sua atividade original. Portanto, os ensaios de purificação devem proporcionar à amostra de veneno o mínimo de alterações na sua composição e consequentemente, em suas atividades biológicas.

O isolamento e purificação das trombinas-símile normalmente utilizam sistemas convencionais de purificação, que consistem de 2 a 3 técnicas cromatográficas, tais como: cromatografia de exclusão molecular (Superdex 75) seguido por purificação em DEAE 5PW e por último em uma coluna Hi Trap Benzamidina FF (Braga *et al.*, 2006); Sephacryl S-200, seguido pela cromatografia de afinidade em resina sepharose-agmatina e cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel CL-6B em pH 8,5 (Magalhães *et al.*, 2007); por cromatografia de exclusão Molecular Sephadex G-75 seguido por cromatografia de afinidade Sepharose 6B Benzamidina ultrafiltrado em um sistema Amicon e HPLC em fase reversa usando uma coluna C-18 (Sant'Ana *et al.*, 2008); coluna A-50 seguido Coluna G-75 e coluna de A-50 (Liu *et al.*, 2009); ou DEAE-Sephacel seguido da coluna de cromatografia Sephadex G-75 e Benzamidina-Sephacel (Costa *et al.*, 2010).

A utilização de várias etapas de purificação faz com que sejam utilizados passos intermediários através de liofilizações, cuja estimativa laboratorial traz consigo a perda de 30 % de material em cada etapa de concentração. O objetivo foi encontrar uma técnica otimizada ou a melhor combinação de técnicas cromatográficas que permitissem isolar as serinoproteases com atividade trombina-símile, mantendo as propriedades destas, tais como sua atividade enzimática e suas atividades biológicas, além de fornecer material com alto grau de homogeneidade molecular e quantidades suficientes para a realização dos experimentos propostos.

Nesse sentido, o grupo de pesquisa tem otimizado e padronizado a metodologia de purificação de serinoproteases com atividade trombina-símile de veneno de serpentes em um único passo cromatográfico, utilizando um sistema de HPLC em uma coluna C18 de fase reversa, assim temos a TLBm de *Bothrops marajoensis* (Vilca-Quispe *et al.*, 2010) e TLBan de *Bothrops andianus* (Valeriano-Zapana *et al.*, 2012). Com a utilização do método proposto, foram purificadas eficientemente duas novas serinoproteases a partir do veneno total de *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri*, denominadas TLBbz e TLBro respectivamente.

A presença de uma trombina-símile foi caracterizada pela atividade proteolítica sobre o substrato cromogênico artificial DL-BAPNA, sendo esta atividade indicativo que a enzima tem

capacidade proteolítica porque atua preferencialmente sobre as ligações arginil. O substrato artificial contém a ligação específica (Arg-Gly), onde atuam as serinoproteases.

As atividades amidolítica estereásica e coagulante só foram encontradas nos picos 12 de ambas cromatografias em HPLC de fase reversa. A atividade catalítica da TLBbz foi 5 vezes maior que a TLBro. O papel do carboidrato sobre a relação estrutura-função das serinoproteases trombina-símile do veneno de serpente ainda não é compreendido totalmente. Em muitos casos, demonstrou-se que a N-glicosilação interfere na atividade catalítica dessas enzimas. No entanto, Komori e Nikai (1998) relataram que, em algumas serinoproteases, os carboidratos são mais importantes para a estabilização de proteínas do que a atividade catalítica. Uma hipótese para a estabilidade é que os glicanos podem direcionar a renaturação da proteína após desnaturação por calor ou pH (Sant'Ana *et al.*, 2008). A diferença na atividade proteolítica das TLBbz e TLBro, pode estar relacionada provavelmente com a glicosilação da proteína.

As serinoproteases possuem um intervalo de massas entre 26 a 67 kDa dependendo das glicosilações, como descritas por Cavinato *et al.*, (1998) e Zaganelli *et al.*, (1996). Assim temos vários relatos: flavoridis de 23 kDa de *Trimeresurus flavoviridis* (Shieh *et al.*, 1988), PABJ de *Bothrops jararaca* 30 kDa (Serrano *et al.*, 1995), TVS-PA de *Trimeresurus stejnegeri* 33 kDa (Zhang *et al.*, 1995), LV-PA de *Lachesis muta* com 33 kDa (Sanchez *et al.*, 2000). Outras apresentam massas moleculares mais elevadas como cerastocitin 38 kDa de *Ceraste cerastes* (Marrakchi *et al.*, 1997), CPIE-2 de *Agkistrodon caliginosus* com 44 kDa (Shimokawa e Takahashi, 1993), Bothrops protease A de *Bothrops jararaca* reportado com 67 kDa (Murayama *et al.*, 2003).

O perfil eletroforético de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida da TLBbz apresentou uma única banda proteica com massa molecular relativa ~35,13 kDa em condições não reduzidas e de 41,36 kDa em condições reduzidas. E para TLBro uma única banda proteica com massa molecular relativa ~20,24 kDa em condições não reduzidas e de 25,34 kDa em condições reduzidas. Como a maioria das enzimas trombinas-símile isoladas até agora, as trombinas-símile são compostas por uma única cadeia polipeptídica, a trombina-símile TLBbz e TLBro, se enquadram dentro desta família de proteínas (Serrano e Maroun, 2005; Kini, 2005).

A presença das serinoproteases nos venenos de *Bothrops brazili* cujo habitat é a mata atlântica e *Bothrops roedingeri* que se encontra restrito ao litoral do Pacífico do Peru, sugere que esses venenos sejam farmacologicamente semelhantes a outros venenos botrópicos. No entanto podem existir diferenças entre os venenos de um mesmo gênero, mas de locais diferentes, como sugerido por Ponce-Soto *et al.*, (2007).

No presente trabalho, foram descritas algumas diferenças na estrutura primária das serinoprotease TLBbz e TLBro. Essas características reveladas entre as serinoproteases através da micro heterogeneidade molecular podem estar relacionadas com as separações geográficas mostradas no processo micro evolutivo relacionado como um todo na eficiência do próprio veneno (Ponce-Soto *et al.*, 2009).

Já a variação individual na composição de venenos, é uma característica comum, em maior ou menor número em todas as espécies de serpentes venenosas Gibbs *et al.*, (2011). Calvete (2010) explica: "Esta teoria relaciona-se com o conceito atual de espécie como uma metapopulação de indivíduos portadores de um mesmo genoma, mas dotado de notáveis diferenças fenotípicas".

A trombina-símile TLBbz e TLBro isoladas a partir do veneno total de *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri* respectivamente mostraram um alto grau de similaridade quando comparadas com outras serinoproteases de veneno de serpentes provenientes das bases de dados (SwissProt data-base <http://br.expasy.org>). Essa homologia entre enzimas coagulantes é confirmada pela presença de resíduos de valina como o primeiro resíduo da região N-terminal e é uma característica comum de uma grande maioria de trombinas-símile de veneno de serpentes (Andrião-Escarso *et al.*, 1997). No entanto aparecem regiões variáveis ao longo da sequência deduzida. A presença de diferenças estruturais entre ambas serinoproteases é devida provavelmente ao fato de serem espécies que habitam diferentes nichos ecológicos, embora possam existir similaridades entre os venenos de um mesmo gênero, mas de regiões diferentes, como sugerido por Ponce-Soto, *et al.*, (2007).

Alternativamente, a diferença estrutural entre a TLBbz e a TLBro, e as outras desta família de proteínas, podem ser atribuídas à magnitude de glicosilações da cadeia polipeptídica. Este fato é possível desde que as enzimas trombina-símile exibam uma micro heterogeneidade molecular, devido às diferenças em suas cadeias polipeptídicas glicosiladas formadas no processo das modificações pós-traducionais, como é o caso das proteínas das serpentes *Agkistrodon rhodostoma* (Hatton, 1973; Burkhart, *et al.*, 1992), *Crotalus horridus horridus* (Shu *et al.*, 1983), *Lachesis muta muta* (Silveira *et al.*, 1989), *Bothrops jararaca* (Serrano *et al.*, 1995) e *Bothrops jararacussu* (Zaganelli *et al.*, 1996).

A tríade catalítica das serinoproteases de mamíferos fica situada no local ativo da enzima onde a catálise acontece e é preservada em todas as enzimas serinoproteases. A tríade é uma estrutura coordenada consistente de três resíduos de aminoácidos essenciais: histidina (His₅₇), serina (Ser₁₉₅) e ácido aspártico (Asp₁₀₂). O PMSF como inibidor forma uma ligação covalente,

reagindo com o resíduo de serina, inibindo sua função. A TLBbz e TLBro mostram um alto grau de conservação estrutural destes resíduos cruciais da atividade catalítica (His₄₄, Asp₈₈ e Ser₁₈₂), como mostrado na sequência de aminoácidos (Figura 16 e 18).

Todas estas serinoproteases são geralmente glicoproteínas, e cada uma contém Asn(N)-ligado aos sítios de glicosilações entre elas nas posições variáveis da sequência. Os resíduos de Cys em suas estruturas formam pontes dissulfeto e estas enzimas são idênticas à tripsina de mamífero (Itoh *et al.*, 1987).

Embora exista informação disponível sobre serinoproteases com atividade trombina-símile procedentes de veneno de serpentes nas bases de dados, existe pouca informação a respeito das sequências, assim como da estrutura tridimensional (3D) desta família de proteínas.

As serinoproteases geralmente contêm 12 resíduos de meia-cistina. A caracterização estrutural das TLBbz e TLBro, mostrou a presença dos sítios altamente conservados na posição His(44), Asp(88) e Ser(182), correspondentes à tríade catalítica.

Com a provável ausência de grupamentos tiol (-SH) livres, na estrutura de ambas enzimas, podemos sugerir que os resíduos de cisteína encontrados são responsáveis pelas pontes dissulfetos, que têm um papel importante na estabilização da estrutura nativa desta enzima. Esta estabilidade é mostrada no estudo cinético de ambas proteases no presente trabalho. Estas pontes dissulfeto são essenciais para a atividade catalítica destas enzimas, uma vez que o tratamento com agentes redutores como β -mercaptoetanol ou ditioneítrito (DTT) as inativam, como descrito para flavoridiobina, originada de *Trimeresurus flavoviridis* (Pirkle, 1998; Tatematsu *et al.*, 2000).

De acordo com Castro *et al.*, (2004), existem seis pares de cisteína encontrados através da estrutura cristalográfica da TSV-PA (ativador do plasminogênio) isolada do veneno de *Trimeresurus stejnegeri* por Zhang *et al.*, (1998) e da crotalase isolada do veneno de *Crotalus adamanteus* por Markland (1976), onde a ponte dissulfeto da posição 136-201 é indicada como a principal na estabilidade dessas serinoproteases. Foi observado que para ambas trombinas-símile, também existem os 12 resíduos de cisteína, onde possivelmente possam formar os seis pares de pontes dissulfetos característicos nas serinoproteases, mantendo a mesma arquitetura molecular.

Os aminoácidos que circundam o sítio catalítico também são importantes na especificidade funcional dessas enzimas, uma vez que sua estrutura secundária, através de suas folhas β e α -hélice, têm papel fundamental nesta especificidade, como é citado para a trombina-símile batroxobin e para o ativador de plasminogênio (Castro *et al.*, 2004).

Sabe-se que o comportamento de uma enzima perante seu substrato e as propriedades exibidas pelo sítio ativo, entre outros fatores, cria a possibilidade de ocorrência de forças de

atração entre a molécula do substrato e os átomos que compõem o sítio ativo da enzima, as quais estão relacionadas por uma complementariedade de carga (Ponce-Soto *et al.*, 2007). Estas interações podem ser eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou mesmo interações hidrofóbicas. A afinidade da enzima pelo substrato depende do número e dos tipos de interações presentes. O fato da estrutura tridimensional da molécula do substrato ser complementar ao centro ativo permite um alto grau de interação e, conseqüentemente, grande afinidade.

As posições do sítio de clivagem do substrato pelas serinoproteases foram estabelecidas por Schechter e Berger (1967). Assim, os aminoácidos na porção N-terminal da cadeia polipeptídica, clivada pela protease são enumerados de acordo com sua posição partindo da ligação (P1, P2, P3...). De outro lado os aminoácidos da porção C-terminal são enumerados como P1', P2', P3', e a serinoprotease possui locais denominados de subsítios e estes estão compostos de um ou mais aminoácidos, os quais interagem com os substratos enumerados como S1 ou S1'. Desta forma, o aminoácido em P1 interage principalmente com S1 (subsítio 1) da enzima, o aminoácido em P2 interage com S2.

O substrato cromogênico sintético, utilizado no presente trabalho foi o N α -benzoil-Arg-pNA o qual apresenta só um resíduo de arginina na posição P1, que se liga com a as trombinas-símbles TLBbz e TLBro na posição S1 que corresponderia provavelmente ao resíduo de aspartato (88) para ambas enzimas (TLBbz e TLBro) presente no centro ativo da enzima. Esta afinidade de união poderia basear-se em interações de ordem eletrostática, já que arginina possui radical de nitrogênio carregados positivamente que podem interagir com aspartato (88), que apresenta cargas negativas, presente na triade catalítica.

Além disso, este resíduo polar ácido poderia incrementar a disponibilidade de cargas na nuvem eletrônica disponibilizando um ambiente de clivagem devido à presença de elétrons livres provenientes de seus dois átomos de nitrogênio na extremidade de sua cadeia presente em S1 do centro ativo da serinoprotease, corroborando assim com a especificidade destas famílias de enzimas por Arg em P1 (Perona *et al.*, 1995).

As trombinas-símile TLBbz e TLBro demonstraram ter atividade sobre N α -benzoil-Arg-pNA, indicando que seu centro ativo se encaixa bem com este substrato. De fato, o K_M da TLBro encontrado para este substrato (0,039 mM) é o mais baixo quando comparado com o K_M de TLBbz (0,853 mM), o que indica uma forte ligação ou grande afinidade. Por outro lado, pode-se inferir que a TLBro contém um centro ativo que se liga muito bem com a N α -benzoil-Arg-pNA.

Isto nos leva a inferir que há um alto grau de semelhança entre os centros ativos de ambas enzimas (TLBbz e TLBro).

Assim as trombina-símile TLBbz e TLBro evidenciam uma cinética semelhante a outras trombinas-símiles procedentes de veneno de serpentes perante o substrato α -benzoil-Arg-pNA; Au *et al.*, (1993); Andrião-Escarso *et al.*, (1997); Cavinato *et al.*, (1998); Petretski *et al.*, (2000); Ponce-Soto *et al.*, (2007); Costa *et al.*, (2009); Vilca-Quispe *et al.*, (2010) e Valeriano-Zapana *et al.*, (2012).

No entanto a TLBro é semelhante a TLBbz que também exibe atividade catalítica perante α -benzoil-Arg-pNA o que sugere que em ambas enzimas existe uma ligação de grande afinidade. Pode-se inferir, portanto que, da mesma forma que com a TLBbz, a TLBro tem um centro ativo de topografia semelhante.

Sabe-se que a trombina humana possui dois subsítios de reconhecimento (do inglês exosites I e II) que estão próximos ao sítio catalítico e que são importantes, dentre outros fatores, para a ligação da trombina com seus substratos naturais. Estes sítios de ligação não estão presentes nas enzimas trombina-símile de veneno de serpentes, o que explica em parte este aparente paradoxo entre atividades parecidas de ambas enzimas (Magalhães *et al.*, 2006).

Em relação ao parâmetro de pH encontram-se o pH ótimo para as TLBbz e TLBro entre 7,0 e 10,0 para TLBbz e 7,0 e 9,0 para TLBro, respectivamente. Estes valores são coerentes com aqueles encontrados por Swenson e Markland, (2005), Ponce-Soto *et al.*, (2007), Vilca-Quispe *et al.*, (2010) e Valeriano-Zapana *et al.*, (2012).

O conteúdo de carboidratos ligados varia entre 0 a 30 % do peso. Os principais N-glicanos que interagem com as serinoproteases caracterizados são: fucose, hexose, ácido siálico N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) manose, galactose e ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) (Castro *et al.*, 2004). O papel do carboidrato sobre a relação estrutura-função da trombina do veneno da serpente ainda não é compreendido totalmente. Em muitos casos, demonstrou-se que a N-glicosilação interfere na atividade catalítica dessas enzimas. No entanto, Komori e Nikai (1998) relataram que, em algumas serinoproteases, os carboidratos são mais importantes para a estabilização de proteínas do que a atividade catalítica. Uma hipótese para a estabilidade é que os glicanos podem direcionar a renaturação da proteína após desnaturação por calor ou pH (Sant'Ana *et al.*, 2008).

A temperatura ótima para atividade das trombinas-símile TLBbz e TLBro, foi em torno de 45 °C, e mesmo a 50 – 55 °C, estas ainda não haviam sofrido uma perda conformacional

mostrada em sua atividade. Este fato relacionado à estabilidade conformacional pode estar relacionado à presença de carboidratos ligados à enzima.

A maioria das serinoproteases atua em diversos substratos naturais e cromogênicos sintéticos e suas propriedades enzimáticas são geralmente afetadas por inibidores específicos tais como PMSF, leupeptina, aprotinina e benzamidina (Braud *et al.*, 2000; Serrano e Maroun, 2005). A susceptibilidade dos inibidores de proteases sobre a TLBbz e TLBro usando N α -benzoil-Arg-pNA como substrato, mostraram que só o PMSF foi capaz de abolir a atividade proteolítica de ambas enzimas significativamente em mais de 50 % da atividade. Este inibidor é altamente específico das serinoproteases e atuam a partir de mecanismos capazes de bloquearem o sítio ativo da enzima, especificamente ao resíduo serina da triade catalítica.

As serinoproteases não são afetadas pelos inibidores de tripsina como SBTI e alfa1-antitripsina (Castro, 2004). No entanto, o SBT-I em alguns casos mostrou seu efeito inibitório em altas concentrações, tais como ACC-C (Orthner *et al.*, 1988) e Cerastocitin (Marrakchi *et al.*, 1995).

Por outro lado EDTA e EGTA foram capazes de inibir a atividade das serinoproteases reportados como Cerastocytin de *Cerastes cerastes* com inibição negativa para heparina e positiva para SBTI (Dekhil *et al.*, 2003) e Batroxobin de *Bothrops atrox* que também apresenta inibição negativa para heparina e SBTI (Serrano, 2005).

Utilizando outros possíveis inibidores tais como L-Cys e D2-II um fator anti-hemorrágico do soro de *Didelphis marsupialis*, foi verificada a inibição da atividade das trombinas-símbles TLBbz e TLBro, mas não atingiram 50 % da inibição da atividade catalítica.

A interação entre S1 e P1 em enzimas trombina-símile é de natureza eletrostática, o que evidencia a especificidade destas enzimas por substratos contendo um aminoácido carregado positivamente em P1, Arg ou Lys. Tal fato se deve à presença de um resíduo de Asp em S1 contendo um grupo carboxílico carregado negativamente. Portanto, a ligação do substrato ao sítio catalítico é favorecida por esta interação. Porém, este tipo de interação certamente não ocorre apenas entre os grupos carregados em S1 e P1, mas em outros grupos do sítio ativo Schechter e Berger (1967). No caso do substrato N α -benzoil-Arg-pNA, ele só exibe um local de união ao sítio catalítico P1, o qual vai se ligar com o subsítios S1 da trombina-símile.

Os cátions presentes no meio provavelmente competem com o substrato pela carga negativa do Asp presente em S1, desfavorecendo a ligação enzima-substrato e consequentemente diminuindo a atividade enzimática. Os cátions com carga dupla exercem um efeito inibidor mais

potente uma vez que competem mais fortemente pela carga negativa do resíduo de Asp no centro ativo da enzima.

Assim, temos que a atividade enzimática das trombinas-símile TLBbz e TLBro foi diminuída na presença de cátions divalentes tais como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} , de forma diferenciada. O Zn^{2+} e Cd^{2+} apresentaram um maior poder inibitório em relação aos outros íons. Este fato é devido provavelmente a uma série de características presentes nos íons divalentes Zn^{2+} e Cd^{2+} que os diferenciam dos outros íons também divalentes, como raio atômico e eletronegatividade ou eletroafinidade. Portanto, soluções com mesma molaridade (5 mM), mas compostas por sais de cátions divalentes com diferentes raio atômico e eletronegatividade resultarão em diferentes forças iônicas; como observado no presente trabalho. As soluções que continham: Zn^{2+} e Cd^{2+} apresentaram um raio atômico e eletronegatividade maior que as soluções que continham Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} .

Uma outra possível explicação para este comportamento das serinoproteases de veneno de serpentes frente a estes cátions reside na possibilidade de existência de alguma interação destes cátions com outra região da enzima diferente do centro ativo, mas que altera a configuração tridimensional do sítio de catálise, interferindo na interação enzima-substrato de tal forma a prejudicar a atividade enzimática. Estes mecanismos permanecem ainda desconhecidos e merecem uma maior investigação.

TLBbz apresentou 321 resíduos de aminoácidos, compostos por 33 Asp/Asn, 21 Glu/Gln, 27 Ser, 33 Gly, 11 His, 14 Arg, 28 Thr, 22 Ala, 24 Pro, 10 Tyr, 18 Val, 4 Met, 12 Cys, 20 Ile, 25 Leu, 7 Phe, 12 Lys. Enquanto TLBro apresentou 183 resíduos de aminoácidos, compostos por 25 Asp/Asn, 14 Glu/Gln, 12 Ser, 17 Gly, 4 His, 6 Arg, 12 Thr, 13 Ala, 14 Pro, 5 Tyr, 10 Val, 3 Met, 12 Cys, 9 Ile, 12 Leu, 7 Phe, 8 Lys. Estes resultados apresentam similaridade com outras serinoproteases, tais como Swenson e Markland, (2005), Ponce-Soto *et al.*, (2007), Vilca-Quispe *et al.*, (2010) e Valeriano-Zapana *et al.*, (2012).

Existem serinoproteases que têm atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica, mas muitas delas clivam especificamente somente fibrinogênio, liberando preferencialmente fibrinopeptídeos A (venombin A) ou fibrinopeptídeos B (venombin B), ou ambos fibrinopeptídeos A e B (venombins AB), promovendo a coagulação. Já que as serinoproteases imitam a função das trombinas de mamíferos de clivar os fibrinopeptídeos A e os fibrinopeptídeos B, elas têm sido conhecidas como enzimas trombina-símile (Markland, 1998; Magalhães *et al.*, 2006; Ponce-Soto *et al.*, 2007; Vilca-Quispe *et al.*, 2010 e Valeriano-Zapana *et al.*, 2012).

No entanto, a leucurobina, apesar de exibir boa atividade liberadora de fibrinopeptídeo A (FP-A) do fibrinogênio, não exibiu o mesmo perfil de atividade da trombina sobre os substratos naturais desta última: a leucurobina não apresenta atividade considerável sobre a cadeia β do fibrinogênio, pois libera fibrinopeptídeo B (FP-B) muito lentamente e não ativa o fator XIII (Magalhães *et al.*, 2006).

As trombinas-símile TLBbz e TLBro revelaram forte atividade coagulante “in vitro” sobre fibrinogênio bovino, os tempos reportados como os inversos na atividade coagulante, mostram que existe apenas uma ligeira diferença entre os três. Assim sendo, a trombina-símile TLBro coagula em menos tempo, em relação à TLBbz e inclusive à trombina bovina. Essa diferença nos tempos de coagulação encontram-se relacionados com a clivagem das cadeias α e/ou β do fibrinogênio, liberando fibrinopeptídios A e/ou B, e esse fato encontra-se relacionado intimamente com o tipo de trombina-símile presente no veneno (Serrano e Maroun, 2005), por isto algumas serinoproteases de veneno de serpentes permitem a liberação de fibrinopeptídios A; (Serrano e Maroun, 2005). Ancrod de *Calloselasma rhodostoma* libera fibrinopeptídios A e B das cadeias α e β do fibrinogênio (Burkhart *et al.*, 1992), Batroxobin (*Bothrops atrox moojeni*) libera fibrinopeptídios A da cadeia α e mais lentamente fibrinopeptídios B da cadeia β (Itoh *et al.*, 1987).

Enquanto as trombinas-símile, a TLBbz degrada apenas a cadeia β , sendo classificada como uma serinoprotease com atividade trombina-símile tipo B; tais como CPI-enzyme-2 de *Agkistrodon caliginosus* (Shimokawa e Takahashi, 1993) e Halystase de *Agkistrodon halys blomhoffii* (Matsui *et al.*, 1998), a TLBro degrada as duas cadeias α e β , liberando o fibrinopeptídeo A e B, sendo classificada como uma serinoprotease com atividade trombina-símile tipo AB, a semelhança de Bilineobin de *Agkistrodon bilineatus* (Komori *et al.*, 1993) e Brevinase de *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus* (Lee *et al.*, 1999). Ambas trombinas-símeis TLBbz e TLBro, mostraram a degradação do fibrinogênio bovino como sendo concentração-dependente ao longo do tempo.

As trombinas-símile TLBbz e TLBro foram previamente incubadas com diferentes intervalos de pH, temperatura e íons divalentes, e observa-se a sua capacidade fibrinogenolítica sobre o fibrinogênio. Nos diferentes intervalos de pH testado (3 a 10), é possível visualizar que a atividade fibrinogenolítica inicia na faixa de 7 a 9, para ambas trombinas-símeis. Por outro lado, quando incubadas a diferentes temperaturas (15 até 70 °C), ambas mostraram uma atividade fibrinogenolítica a partir de 30 a 55 °C. Estes resultados sugerem que as trombinas-símile TLBbz e TLBro são serinoproteases termoestáveis como a maioria das enzimas provenientes de veneno

de serpentes que agem sobre a degradação do fibrinogênio (Stocker *et al.*, 1982; Markland, 1998).

A atividade fibrinogenolítica na presença de íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} evidenciou-se um efeito inibitório marcado perante os íons Zn^{2+} e Cd^{2+} e ligeiramente frente aos íons Mn^{2+} e uma baixa ou nula inibição perante os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} .

As trombinas-símile TLBbz e TLBro exercem seu papel apenas na etapa de proteólise do fibrinogênio. A etapa de polimerização não sofre interferência das enzimas, já que é um processo espontâneo. Porém, esta etapa de polimerização não sofre inibição perante os íons cálcio. Tal efeito foi descrito por Brass *et al.*, (1978). Em seu trabalho Brass mostrou que o cálcio não é necessário, mas quando presente ainda acelera a polimerização da fibrina, reduzindo o tempo de coagulação. Em outro trabalho, Kanaide *et al.*, (1982) mostraram que não só o cálcio, mas diversos íons divalentes, zinco entre eles, aceleram a polimerização de fibrina, reduzindo da mesma forma o tempo de coagulação. Esse fato não foi observado nas TLBbz e TLBro.

Masahisa *et al.*, (1983) descreveram que além do cálcio, o magnésio também reduz o tempo de coagulação. Já em um trabalho de Marx (1988), está descrito que o magnésio, na concentração de 0,5 mM, não altera significativamente a formação do coágulo de fibrina. De posse destas observações a seguinte hipótese se torna plausível para explicar o comportamento verificado para as enzimas TLBbz e TLBro perante o cálcio e magnésio:

a) O Ca^{2+} inibe a atividade de proteólise do fibrinogênio pela enzimas TLBbz e TLBro, por seu efeito de inibidor competitivo, devido à sua interação com o resíduo de Asp no centro ativo, mas pelo seu efeito acelerador sobre a polimerização dos monômeros de fibrina os tempos de coagulação são semelhantes àqueles obtidos na ausência de cálcio.

b) O Mg^{2+} apresentou o mesmo efeito e provavelmente isto é devido ao fato de apresentar uma carga dupla assim como o Ca^{2+} . Porém, o efeito do Mg^{2+} sobre a polimerização foi descrito na literatura de forma controversial já que alguns trabalhos relatam que o magnésio reduz o tempo de coagulação enquanto outros relatam que este não interfere na polimerização.

Existem relatos de serinoproteases trombina-símile com atividade de agregação plaquetária tais como Bothrombin de *B. jararaca* (Nishida *et al.*, 1994), Cerastocitin de *Cerastes cerastes* (Marrakchi *et al.*, 1995), PA-BJ de *B. jararaca* (Serrano *et al.*, 1995) entre outras. Os resultados mostram que ambas enzimas TLBbz e TLBro tem capacidade de agregar plaquetas e em concentração de 5 μg exibe um comportamento semelhante à trombina, atingindo 80 % de agregação. Ambas enzimas começam agregar em tempos diferentes assim a TLBbz começa aos 2 minutos, a TLBro a 1 minuto.

A trombina gerada durante a ativação do processo de coagulação, após o dano do vaso sanguíneo, ativa as plaquetas pela clivagem dos receptores ativados de proteinases PAR1 e PAR4 (Covic *et al.*, 2000) e também através da união aos receptores da GPIba (Mazzucato *et al.*, 1998). Os resultados poderiam sugerir que as enzimas TLBbz e TLBro ativam a agregação plaquetária diretamente por clivagem proteolítico dos PARs, como foi observado pela PA-Bj (*Bothrops jararaca*) (Santos *et al.*, 2000), ou pela união aos receptores da GPIba como sugerido para a serinoprotease Bothrombin (*Bothrops jararaca*) (Nishida *et al.*, 1994).

Todas estas informações podem servir como uma nova plataforma de resultados que solidificarão e permitirão no futuro, o melhor esclarecimento dos mecanismos ainda desconhecidos desta família de proteínas, e desta forma resultando em uma melhor compreensão do envenenamento ofídico.

VI. CONCLUSÕES

A metodologia otimizada de purificação em HPLC de fase reversa permitiu purificar as serinoproteases TLBbz e TLBro sem perder a atividade enzimática de carácter trombina-símile a partir do veneno total de serpente (*Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri*).

As características fisicoquímicas da TLBbz e TLBro revelaram que as massas moleculares estão dentro do intervalo da família das serinoproteases tipo trombina-símile. A análise de composição de aminoácidos da TLBbz e TLBro mostraram a presença de 12 cisteínas que sugerem a formação de 6 pontes dissulfeto e a variação na quantidade dos aminoácidos que as compõem, revelando que ambas apresentam carácter ácido.

As constantes cinéticas revelaram que mesmo TLBbz apresentando altos valores de V_{\max} e K_M comparados à TLBro: baixo V_{\max} e baixo K_M , a TLBbz exibe uma maior eficiência enzimática pelo substrato.

A TLBbz e TLBro mostraram um alto grau de similaridade quando comparadas com outras serinoproteases de veneno de serpentes; essa homologia entre enzimas coagulantes foi confirmada pela presença de resíduos de valina como o primeiro resíduo da região N-terminal e é uma característica comum de uma grande maioria de trombinas-símile de veneno de serpentes.

As características bioquímicas da TLBbz e TLBro revelaram que estas duas enzimas tem boa estabilidade perante a diferentes condições de temperatura e pH. A atividade proteolítica com variações de pH, temperatura, íons e inibidores específicos das serinoproteases permitiram conhecer as características das duas trombinas-símeis.

A TLBbz e TLBro mostraram atividade fibrinogenolítica liberando fibrinopeptídios α e β do fibrinogênio bovino sendo que a TLBbz é agrupada como venombin tipo B por clivar a cadeia β e a TLBro agrupada no grupo venombin AB por hidrolisar a cadeia α e β .

Além disso, a TLBbz e TLBro foram capazes de induzir agregação plaquetária resultando em um agravamento do quadro clínico do acidentado pela formação de trombos plaquetários.

Todos esses resultados permitem uma maior compreensão sobre a estrutura e função da serinoprotease tipo trombina-símile, as quais poderão contribuir para avanços na terapêutica e elucidação do mecanismo de envenamento ofídico.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 5;215(3): 403-10.
- Amiconi, G.; Amoresano, A.; Boumis, G.; Brancaccio, A.; De Cristofaro, R.; De Pascalis, A. et al. (2000) A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. *Biochemistry*, v.39, p.10294- 10308.
- Andrião-Escarso, S.H.; Sampaio, S.V.; Cunha, O.A.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Giglio, J.R. (1997) Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom. *Toxicon.* 35(7):1043-52.
- Angulo, Y.; Lomonte, B. (2009) Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, v. 54, p. 949–957.
- Araujo, M. (2003) Ofidismo In: Pitta, G.B.B.; Castro, A.A.; Burihan, E. *Angiologia e Cirurgia Vascular*. Maceió: UNCISAL/ECMAL e LAVA. Disponível em: URL: <http://www.lava.med.br/livro>.
- Ariëns, R.A.; Lai, T.S.; Weisel, J.W.; Greenberg, C.S.; Grant, P.J. (2002) Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood.* 1;100(3):743-54.
- Au, L.C.; Lin, S.B.; Chou, J.S.; Teh, G.W.; Chang, K.J.; Shih, C.M. (1993) Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for ancrod, a thrombin-like enzyme from the venom of *Calloselasma rhodostoma*. *J. Biochem.* Vol. 294, p.387-390.
- Azañero, M.; Escobar, E.; Yarleque, A. (2000) Purificación de una enzima proteolítica del veneno de *Bothrops brazili* y estudio de su actividad sobre fibrinogeno. *Ver. Peru. Biol.* Vol. 7 N°1.
- Barros, L.C.; Ferreira, R.S. Jr.; Barraviera, S.R.; Stolf, H.O.; Thomazini-Santos, I.A.; Mendes-Giannini, M.J.; Toscano, E.; Barraviera, B. (2009) A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 12, p. 553-571.
- Bawaskar, H.S. (2004) Snake venoms and antivenoms: Critical supply issues. *J Assoc Physicians India* 52: 11–13
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. (2007) *Biochemistry*. Sexta Ed. New York: W.H. Freeman.
- Bidlingmeyer, B.A.; Gohem, S.A.; Tarvin, T.L. (1984) Rapid analysis of aminoacids using pre column derivatization. *J. Chromatogr.*, 336: 93-104.
- Blann, A.D.; Landray, M.J.; Lip, G.Y. (2002) ABC of antithrombotic therapy: an overview of antithrombotic therapy. *British Medical Journal (Clinical Research ed.)*, v. 325, p. 762–765.
- Boon, G.D. (1993) An overview of hemostasis. *Toxicologic Pathology*, v. 21, p. 170-179.
- Born, G.V.R.; Cross, M.J. (1963) The aggregation of blood platelets. *J Physiol.* Vol. 168, p.178-195.
- Bortoleto, R.K.; Murakami, M.T.; Watanabe, L.; Soares, A.M.; Arni, R.K. (2002) Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*, v. 40, p. 1307–1312.
- Braga, M.D.M.; Martins, A.M.C.; de Menezes, D.B.; Barbosa, P.S.F.; Evangelista, J.S.A.M.; Toyama, M.H.; Toyama, D.O.; Fonteles, M.C.; Monteiro, H.S.A. (2006) Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon.* Vol. 49, p.329-338.

- Brass, E.P.; Forman, W.B.; Edwards, R.V.; Lindan, O. (1978) Fibrin formation: effect of calcium ions. *Blood*, v.52(4), p.654-658.
- Braud, S.; Bon, C.; Wisner, A. (2000) Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*, v. 82, p. 851-859.
- Burkhart, W.; Smith, G.F.H.; Su, J.L; Parikh, I.; Levine III, H. (1992) Amino acid sequence determination of ancrod, the thrombin-like fibrinogenase from the venom of *Agkistrodon rhodostoma*. *FEBS Letters*, v. 297, p.297-301.
- Calvete, J.J. (2010) Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. *Toxicon*. 15;56(7):1284-91.
- Calvete, J.J.; Marcinkiewicz, C.; Monleón, D.; Esteve, V.; Celda, B.; Juárez, P.; Sanz, L. (2005) Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon*. 15;45(8):1063-74.
- Campbell, J.A.; Lamar, W.W. (1989) *The Venomous Reptiles of Latin America*. Comstock, Ithaca and London.
- Campbell, J.A.; Lamar, W.W. (2004) *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. 2 volumes. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London. 870. 1500 plates.
- Campbell, J.E.; Brummel-Ziedins, K. E.; Butenas, S.; Mann, K.G. (2011) Cellular regulation of blood coagulation: a model for venous stasis. *Blood*. 23;116(26):6082-91.
- Cardoso, J.C.L.; Brando, R.B. (1982) Acidentes por animais peçonhentos. São Paulo, Santos, p. 165-176.
- Castro, H.C.; Silva, D.M.; Craik, C.; Zingali, R.B. (2001) Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim Biophys Acta*, v.1547, p.183-195.
- Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Albuquerque, M.G.; Pujol-Luz, M.; Rodrigues, C.R. (2004) Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cellular and Molecular Life Sciences*, p.843-856.
- Cavinato, R.A.; Remold, H.; Kipnis, T.L. (1998) Purification and characterization of thrombin-like activity from the venom of *Bothrops atrox* of different geographic region. *Toxicon*. Vol. 36, p.257-268.
- Clemetson, K.J.; Lu, Q.; Clemetson, J.M. (2005) Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 34(4-5):150-5.
- Costa, F.L.S.; Rodrigues, R.S.; Izidoro, L.F.M.; Menaldo, D.L.; Hamaguchi, A.; Homs-Brandeburgo, M.I.; Fuly, A.L.; Soares, S.G.; Selistre-De-Araújo, H.S.; Barraviera, B.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M. (2009) Biochemical and Functional Characterization of a Thrombinlike enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*, v. 54, p. 725-735.
- Costa, J.O.; Fonseca, K.C.; Mamede, C.C.N.; Beletti, M.E.; Santosfilho, N.A.; Soares, A.M.; Arantes, E.C.; Hirayama, S.N.S.; Selistre-De-Araújo, H.S.; Fonseca, F.; Henrique-Silva, F.; Penhasilva, N.; Oliveira, F. (2010) Bhalternin: Functional and Structural Characterization of a new Thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon*, v. 55, p. 1365-1377.
- Costa, T.R.; Menaldo, D.L.; Oliveira, C.Z.; Santos-Filho, N.A.; Teixeira, S.S.; Nomizo, A.; Fuly, A.L.; Monteiro, M.C.; de Souza, B.M.; Palma, M.S.; Stábeli, R.G.; Sampaio, S.V.; Soares, A.M. (2008) Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides*, 29, 10, 1645-1656.
- Covic, L.; Gresser, A.L.; Kuliopulos, A. (2000) Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*. 9;39(18):5458-67.
- Cruz, L.S.; Vargas, R.; Lopes, A.A. (2009) Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethnicity and Disease*. Spring;19(1 Suppl 1):S1-42-6.

- Dang, Q.D.; Vindigni, A.; Di Cera, E. (1995) An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.92, p.5977-5981.
- Davie, E. W. (2003) A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 278, p. 50819-50832.
- De Filipis, V.; De Dea, E.; Lucatello, F.; Frasson, R. (2005) Effect of Na⁺ binding on the conformation, stability and molecular recognition properties of thrombin. *Biochemical Journal*, v.252, p.1-23.
- Dekhil, H.; Wisner, A., Marrakchi, N., El Ayeb, M., Bon, C., Karoui, H., (2003). Molecular cloning and expression of a functional snake venom serine proteinase, with platelet aggregating activity, from the *Cerastes cerastes* viper. *Biochemistry* 42, 10609–10618.
- Deng, Z.; Wang, S.; Li, Q.; Ji, X.; Zhang, L.; Hong, M. (2010) Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from the polychaete, *Neanthes japonica* (Iznka). *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1954–1960.
- Di Cera, E.; Guinto, E.R.; Vindigni, A.; Dang, Q.D.; Ayala, Y.M.; Wuyi, M.; Tulinsky, A. (1995) The Na⁺ binding site of thrombin. *J Biol Chem*, v.270, p.22089- 22092.
- Dobromirski, M.; Cohen, A.T. (2012) How I approach venous thromboembolism risk in hospitalised medical patients. *Blood*. [Epub ahead of print]. doi:10.1182/blood-2012-03-378901.
- Edgar W.; Prentice, C.R.M. (1973). The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. *Thromb. Res.* v. 2:85-95.
- Erlanger, B.P.; Kokowsky, N.; Cohen, W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*, Vol. 95, p.271-278.
- Escoubas, P.; King, G.F. (2009) Venomics as a drug discovery platform. *Expert Rev Proteomics*. 6(3):221-4.
- Franchini, M.; Mannucci, P.M. (2011) Thrombogenicity and cardiovascular effects of ambient air pollution. *Blood*. 1;118(9):2405-12.
- Franco, R.F. (2001) Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto. Simpósio Hemostasia e Trombose*, v. 34, p. 229-237.
- Friberger, P. (1982) Chromogenic peptide substrates. Their use for the assay of factors in the fibrinolytic and the plasma kallikrein-kinin systems. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*;162:1-298.
- Friberger, P.; Gallimore, M.J. (1991) Chromogenic peptide substrate assays and their clinical applications. *Blood Reviews*, v.5, p.117-127.
- Garcia, L.T.; Parreiras e Silva, L.T.; Ramos, O.H.; Carmona, A.K.; Bersanetti, P.A.; Selistre-De-Araujo, H.S. (2004) The effect of posttranslational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 138, p. 23–32.
- Gibbs, H.L.; Sanz, L.; Chiucchi, J.E.; Farrell, T.M.; Calvete, J.J. (2011) Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). *J Proteomics*. 6;74(10):2169-79.
- Guinto, E.R., Caccia, S., Rose, T., Futterer, K., Waksman, G., Di Cera, E. (1999) Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.96, p.1852-1857.
- Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. (2003) Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: Cardoso, J. L. C., França, F. O. S., Wen, F. H., Málaque, C. M. S., Haddad, V. (Eds.). *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier: São Paulo, p. 310–323.
- Gutiérrez, J.M.; Ownby, C.L.; Odell, G.V. (1984) Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 40, p. 367–379.

- Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A.; Chaves, F.; Díaz, C.; Escalante, T. (2009) Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, v. 54, p. 958–975.
- Gutiérrez, J.M.; Solano, G.; Pla, D.; Herrera, M.; Segura, A.; Villalta, M.; Vargas, M.; Sanz, L.; Lomonte, B.; Calvete, J.J.; León, G. (2012) Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: From the lethality neutralization assay to antivenomics. *Toxicon*. pii: S0041-0101(12)00811-2. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.11.016.
- Gutiérrez, J.M.; Theakston, R.D.; Warrell, D.A. (2006) Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med.* 3(6):e150.
- Halfon, S.; Craik, C.S. (1998). Trypsin. Pp. 12–21 in A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner, eds. *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic Press, London.
- Hatton, M.W. (1973) Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodostoma* venom. Isolation and some properties of the enzyme. *Biochem J.* 131(4):799-807.
- Henrikson, R.L.; Meredith, S.C. (1984) Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. V.136, p. 65-71.
- Huancahuire-Vega, S.; Ponce-Soto, L.A.; Martins-de-Souza, D.; Marangoni, S. (2009) Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. *Toxicon*. In press.
- Huang, K.; Zhao, W.; Gao, Y.; Wei, W.; Teng, M.; Niu, L. (2011) Structure of saxthrombin, a thrombin-like enzyme from *Gloydius saxatilis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 1;67(Pt 8):862-5.
- Isla, M.; Málaga, O.; Yarleque, A. (2003) Características Bioquímicas y Acción Biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. *Anales da Fac. Méd. UNMSM* 156-166.
- Itoh, N.; Tanaka, N.; Mihashi, S.; Yamashina, I. (1987) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J. Biol. Chem.* Vol. 262, p.3132–3135.
- Iwasaki, A.; Shieh, T.C.; Shimohigashi, Y.; Waki, M.; Kihara, H.; Ohno, M. (1990) Purification and characterization of a coagulant enzyme, okinaxobin I, from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (Himehabu snake) which releases fibrinopeptide B. *Journal of Biochemistry*. v.108, p. 822-828.
- Jeong, H.; Yoo, S.; Kim, E. (2001) Cell surface display of salmobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* venom on *Escherichia coli* using ice nucleation protein. *Enzyme and Microbial Technology*. Volume 28, Issues 2–3, 155–160.
- Kamiguti, A.S.; Hay, C.R.; Theakston, R.D.; Zuzel, M. (1996) Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 34(6):627-42.
- Kanaide, H.; Uranishi, T.; Nakamura, M. (1982) Effect of divalent cations on the conversion of fibrinogen to fibrin and fibrin polymerization. *American Journal of Haematology*, v.13, p.229-237.
- Kasturiratne, A.; Wickremasinghe, A.R.; de Silva, N.; Gunawardena, N.K.; Pathmeswaran, A.; Premaratna, R.; Savioli, L.; Lalloo, D.G.; de Silva, H.J. (2008) The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* 4; 5(11):e218.
- Kini, R.M. (2005) Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. *Pathophysiol Haemost. Thromb.* Vol. 34, p.200–204.
- Komori, Y.; Nikai, T. (1998) Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzyme from snake venoms. *J. Toxicol., Toxin Rev.*, v.17, p.261-277.

- Komori, Y.; Nikai, T.; Ohara, A.; Yagihashi, S.; Sugihara, H. (1993) Effect of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom of common cantil (*Agkistrodon bilineatus*). *Toxicon*, v. 31, p. 257-270.
- Kornalik, F. (1985) The influence of snake venom enzymes on blood coagulation *Pharmacology & Therapeutics*, v. 29, p. 353-405.
- Kornalik, F. (1990) Toxins affect blood coagulation and fibrinolysis. In: *Handbook of toxicology*. Shier, W.T.; Mebs, D. (eds), Marcel Dekker, New York, v.18, p. 697-709.
- Krem, M.M., Di Cera, E. (2001) Molecular markers of serine protease evolution. *EMBO J.* v.20, p.3036-3045.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins among the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. Vol. 227, p.680-685.
- Lazo, F.; Rodriguez, E.; Yarleque, A. (1998) Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa A en venenos de serpientes. *Rev. Peru. Biol.* 5(2) 98-102.
- Lee W.H., Du X.Y., Lu Q.M., Clemetson K.J., Zhang Y. (2003). Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI. *Thromb. Haemostasis*; 90:662-671.
- Lee, J.W.; Seu, J.H.; Rhee, I.K.; Jin, I.; Kawamura, Y.; Park, W. (1999) Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 14;260(3):665-70.
- Lesk, A.M.; Fordham, W.D. (1996) Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *Journal Molecular Biology*, v.258, p.501-537.
- Liu, S.; Sun, M.Z.; Sun, C.; Zhao, B.; Greenaway, F.T.; Zheng, Q., (2009) A novel serine protease from the snake venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. *Toxicon* 52, 760-768.
- Lu, O.; Clemetson, J.M.; Clemetson, K.J. (2005) Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. Vol.3 (8), p. 1791–1799.
- Ma, W.; Tang, C.; Lai, L. (2005) Specificity of Trypsin and Chymotrypsin: Loop-Motion-Controlled Dynamic Correlation as a Determinant. *Biophys J.* 89(2):1183-93.
- Magalhaes, A.; Campos-Brasil da Fonseca, B.; Ribeiro Diniz, C.; Gilroy, J.; Richardson, M. (1993) The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme/gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *FEBS Lett.* 329:116-120.
- Magalhães, A.; Magalhães, H.P.; Richardson, M.; Gontijo, S.; Ferreira, R.N.; Almeida, A.P.; Sanches, E.F. (2007) Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 146, p. 565-575.
- Magalhães, H.P.B.; Magalhães, A.; Juliano, L.; Nelson, D.L.; Rogana, E. (2006) Mechanism of action and determination of the best substrate for a thrombin-like enzyme from *Lachesis muta muta* venom by regression analysis of the kinetic parameters determined with peptidyl p-nitroanilide substrates. *Toxicon*, v.47, p.453-458.
- Markland, F.S. (1998) Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. Vol. 36, p.1749-800.
- Markland, F.S.; Damus, P.S. (1971) Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (Eastern diamondback rattlesnake). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 246, p. 6460-6470.
- Markland, Jr. F.S. (1991) Inventory of α and β fibrinogenases from snake venoms. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, v. 65, p. 438–443.
- Markland, Jr. F.S. (1997) Snake venoms. *Drugs*, v.54, p.1-10.
- Markland, Jr. F.S. (1976) Crotalase. *Methods Enzymol.*;45:223–236.

- Marrakchi, N.; Barbouche, R.; Guermazi, S.; Bon, C.; El Ayeb, M. (1997) Procoagulant and platelet-aggregating properties of cerastocytin from *Cerastes cerastes* venom. *Toxicon*. 35(2):261-72.
- Marrakchi, N.; Zingali, R.B.; Karoui, H.; Bom, C.; El Ayeb, M. (1995) Cerastocytin, a new thrombin-like platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. *Biochim Biophys Acta*, v.1244, p.147-156.
- Marsh, N., Williams, V. (2005) Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*, v.45, p.1171-1181.
- Marsh, N.A. (1994) Snake venoms affecting the haemostatic mechanism. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: an International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. v. 5, p. 399–410.
- Marsh, N.A.; Williams, V. (2005) Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*, v. 45, p. 1171–1181.
- Marx, G. (1988) Zinc binding to fibrinogen and fibrin. *Arch of Biochem and Bioph*, v.266-1, p.285-288.
- Masahisa, O., Blomback, B. (1983) Calcium and fibrin gel structure. *Thrombosis Research*, v.29(3), p.269-280.
- Matsui, T.; Fujimura, Y.; Titani, K. (2000) Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1477, p. 146–156.
- Matsui, T.; Hamako, J.; Titani, K. (2010) Structure and function of snake venom proteins affecting platelet plug formation. *Toxins*, v. 2, p. 10-23.
- Matsui, T.; Sakurai, Y.; Fujimura, Y.; Hayashi, I.; Oh-Ishi, S.; Suzuki, M.; Hamako, J., Yamamoto, Y., Yamazaki, J., Kinoshita, M., Titani, K., (1998). Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. *European Journal of Biochemistry* 252, 569-575.
- Mazzucato, M.; Marco, L.D.; Masotti, A.; Pradella, P.; Bahou, W.F.; Ruggeri, Z.M. (1998) Characterization of the initial alpha-thrombin interaction with glycoprotein Ib alpha in relation to platelet activation. *J Biol Chem*. 273(4):1880-7.
- Ministério da Saúde. (2001) Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde.
- Ministerio de Salud - norma técnica sobre prevención y tratamiento de accidentes por animales ponzoñosos - NT No. 007-MINSA/DGSP-V.01.
- Moura-Da-Silva, A.M.; Butera, D.; Tanjoni, I. (2007) Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. *Current Pharmaceutical Design*, v. 13, p. 2893–2905.
- Muniz, E.G.; Maria, W.S.; Estevão-Costa, M.I.; Buhrnheim, P.; Olortegui, C.C. (2000) Neutralizing potency of horse antithrombotic Brazilian antivenom against Bothrops snake venoms from the Amazonian rain forest. *Toxicon* 38: 1859-63.
- Murayama, N.; Saguchi, K.; Mentele, R.; Assakura, M.T.; Ohi, H.; Fujita, Y.; Camargo, A.C.; Higuchi, S.; Serrano, S.M. (2003) The unusual high molecular mass of Bothrops protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. *Biochim Biophys Acta*. 3;1652(1):1-6.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2011) *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Quinta ed. Editora: Sarvier.
- Niewiarowski, S.; Kirby, E.P.; Brudzynski, T.M.; Stocker, K. (1979) Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry*, v.18, p.3570-3577.

- Nikai, T.; Ohara, A.; Komori, Y.; Fox, J.W.; Sugihara, H. (1995) Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. Arch Biochem Biophys, v.318, p.89-96.
- Nishida, S.; Fujimura, Y.; Miura, S.; Ozaki, Y.; Usami, Y.; Suzuki, M.; Titani, K.; Yoshida, E.; Sugimoto, M.; Yoshioka, A.; et al. (1994) Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. Biochemistry, v.33, p.1843-1849.
- Oliveira, F.; Homs-Brandeburgo, M.I. (2004) Processo de purificação e uso da enzima anticoagulante e trombolítica Bthtl proveniente de peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. Patente: Privilégio de Inovação. n. PI0406273-6.
- Olivo Rdo, A.; Teixeira, C.F.; Wallace, J.L.; Gutierrez, J.M.; Zamuner, S.R. (2007) Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. Toxicon. 49(5):670-7.
- Orthner, C.L.; Bhattacharya, P.; Strickland, D.K. (1988). Characterization of a protein C activator from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*. Biochemistry 27, 2558–2564.
- Ouyang, C.; Teng, C.M. (1976) Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. Biochem. Biophys Acta. Vol. 420, p.298-308.
- Parry, M.A.; Jacob, U.; Huber, R.; Wisner, A.; Bon, C.; Bode, W. (1998) The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. Structure, v.6, p.1195-1206.
- Perales, J.; Neves-Ferreira, A.G.C.; Valente, R.H.; Domont, G.B. (2005) Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. Toxicon, v. 45, p. 1013 - 1020.
- Perona, J.J.; Craik, C.S. (1997) Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. J Biol Chem. 28;272(48):29987-90.
- Perona, J.J.; Hedstrom, L.; Rutter, W.J.; Fletterick, R.J. (1995) Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. Biochemistry, v.34, p.1489-1499.
- Petretski, J.H.; Kanashiro, M.; Silva, C.P.; Alves, E.W.; Kipnis, T.L. (2000) Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. Braz. J. Med. Biol. Res. Vol. 33, p.1293–1300.
- Pinho, F.M.; Zanetta, D.M.; Burdmann, E.A. (2005) Acute renal failure after *Crotalus durissus* snakebite: a prospective survey on 100 patients. Kidney Int.67:659–667.
- Pinho, F.M.O.; Oliveira, E.S.; Faleiros, F. (2004) Acidente ofídico no Estado de Goiás. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 50, p. 93-96.
- Pirkle, H. (1998) Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Thrombosis and Haemostasis, v. 79, p. 675-683.
- Pirkle, H.; Theodor, I.; Lopez, R. (1989) Catroxobin, a weakly thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus atrox*. NH2-terminal and active site amino acid sequences. Thrombosis Research, v. 56, p. 159–68.
- Pirkle, H.; Theodor, I.; Miyada, D.; Simmons, G. (1986) Thrombin-like enzyme from the venom of *Bitis gabonica*. Purification, properties, and coagulant actions. Journal of Biological Chemistry, v. 261, p. 8830–8835.
- Ponce-Soto, L.A.; Barros, J.C.; Marangoni, S.; Hernandez, S.; Dal Belo, C.A.; Corrado, A.P.; Hyslop, S.; Rodrigues-Simioni, L. (2009) Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA2 isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 150(2):291-7.
- Ponce-Soto, L.A.; Bonfim, V.L.; Novello, J.C.; Navarro Oviedo, R.; Yarlequé Chocas, A.; Marangoni, S. (2007) Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. The Protein Journal. Vol. 26(6), p.387-394.
- Radomski M., Moncada S. (1983). An improved method for washing of human-platelets with prostacyclin. Thrombosis Research. 383-389.

- Ramos, O.H.P.; Carmona, A.K.; Selistre-De-Araujo, H.S. (2003) Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom prometalloprotease. *Protein Expression and Purification*. v. 28, p. 34–41.
- Rodrigues, V.M.; Soares, A.M.; Guerra-as, R.; Rodrigues, V.; Fontes, M.R.M.; Giglio, J.R. (2000). Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrinogenolytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 381:213-224.
- Rojas, E.; Quesada, L.; Arce, V.; Lomonte, B.; Rojas, G.; Gutierrez, J.M. (2005) Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. Snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Tropica* 93:85-95.
- Rosing, J.; Govers-Riemslog, J.W.; Yukelson, L.; Tans, G. (2001) Factor V activation and inactivation by venom proteases. *Haemostasis*. v.31, p.241-246.
- Rucavado, A.; Escalante, T.; Teixeira, C.F.P.; Fernandes, C.M.; Díaz, C.; Gutiérrez, J.M. (2002) Increments in cytokines and matrix Metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators of Inflammation*, v. 11, p. 121–128.
- Sajevic, T.; Leonardi, A.; Križaj, I. (2011) Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*. 57(5):627-45.
- Sakai, J.; Zhang, S.; Chen, H.; Atsumi, F.; Matsui, T.; Shiono, H.; Sanada, S.; Okada, T. (2006) Primary structure of a thrombin-like serine protease, kangshuanmei, from the venom of *Agkistrodon halys brevicaudus stejneger*. *Toxicon* 48:313-322.
- Sanchez, E.E.; Galan, J.A.; Powell, R.L.; Reyes, S.R.; Soto, J.G.; Russell, W.K.; Russell, D.H.; PEREZ, J.C. (2005) Disintegrin, hemorrhagic, and proteolytic activities of Mohave rattlesnake, *Crotalus scutulatus scutulatus* venoms lacking Mojave toxin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 141, p. 124–132.
- Sanchez, E.F.; Santos, C.I.; Magalhaes, A.; Diniz, C.R.; Figueiredo, S.; Gilroy, J.; Richardson, M. (2000) Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Jun 1;378(1):131-41.
- Sant' Ana, C.D.; Ticli, F.K.; Oliveira, L.L.; Giglio, J.R.; Rechia, C.G.; Fuly, A.L.; Selistre de Araújo, H.S.; Franco, J.J.; Stabeli, R.G.; Soares, A.M.; Sampaio, S.V. (2008) BjuusuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*. Vol. 151(3), p.443-54.
- Santoro, M.L.; Sano-Martins, I.S. (2003) Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.; Fan, H.W.; Málaque, C.M.S.; Haddad Jr., V. (Eds.). *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier: São Paulo, p. 289–309.
- Santos, B.F.; Serrano, S.M.; Kuliopulos, A.; Niewiarowski, S. (2000) Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. *FEBS Lett.* 21;477(3):199-202.
- Schechter, I.; Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. v.27, p.157-162.
- Serrano, S.M.T.; Maroun, R.C. (2005) Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, v. 45, p. 1115-1132.
- Serrano, S.M.T.; Reinhardt, M.; Sampaio, C.A.M.; Fink, E. (1995) Purification, characterization and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. Vol. 34, p.7186-7193.

- Shieh, T.C.; Kawabata, S.I.; Kihara, H.; Ohno, M.; Iwanaga, S. (1988) Amino acid sequence of a coagulant enzyme, flavoxobin, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. Journal of Biochemistry, v. 103, p. 596-605.
- Shimokawa, K.; Takahashi, H. (1993) Some properties of a capillary permeability-increasing enzyme-2 from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (Kankoku-Mamushi). Toxicon. 31(10):1221-7.
- Shively, J.; Paxton, R.J.; Lee, T.D. (1989) Highlights of protein structural analysis. Trends in Biochemical Sciences. v. 14, p. 246-252.
- Shu, Y.Y.; Moran, J.B.; Geren, C.R. (1983) A thrombin-like enzyme from timber rattlesnake venom. Biochim Biophys Acta. 28;748(2):236-44.
- Siigur, J.; Siigur, E. (1992). The direct acting fibrin(ogen)olytic enzymes from snake venoms. Journal of Toxicology. Toxin Reviews, v. 9, p. 91-113.
- Silva Jr., F.P.; De-Simone, S.G. (2004) S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? Bioorganic and Medicinal Chemistry. v.12, p.2571-2587.
- Silveira, A.M.; Magalhães, A.; Diniz, C.R.; de Oliveira, E.B. (1989) Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. Int J Biochem. 21(8):863-71.
- Sitprija V. (2006) Snakebite nephropathy. Nephrology. 11:442-448.
- Solis, C.; Escobar, E.; Yarleque, A.; Gutierrez, S. (1999) Purificación y caracterización de la L-amino ácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "Jergon shushupe". Ver. Peru. Biol. Vol 6 N °1.
- Stocker, K. F.; Barlow, G.H. (1976) The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). Methods in Enzymology. v. 45, p. 214-223.
- Stocker, K.F.; Fischer, H.; Meier, J. (1982) Thrombin-like snake venom proteinases. Toxicon 20, 265-273.
- Swenson, S.; Markland, Jr., F.S. (2005) Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. Toxicon. v. 45, p. 1021-1039.
- Tan, N.H. (2010) Isolation and characterization of the thrombin-like enzyme from *Cryptelytrops purpureomaculatus* venom. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 151, p. 131-136.
- Tatematsu, R.; Komori, Y.; Nikai, T. (2000) A new thrombin-like enzyme, flavoviridiobin from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (habu) venom. J Nat Toxins, v.9, p.327-339.
- Valeriano-Zapana, J.A.; Segovia-Cruz, F.S.; Rojas-Hualpa, J.M.; Martins-de-Souza, D.; Ponce-Soto, L.A.; Marangoni, S. (2012) Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. Toxicon 59 (2), 231-240.
- Verstraete, M.; Vermynen, J. (1989) Determinantes celulares, químicos e reológicos da trombose e fibrinólise. Trombose. São Paulo: Sarvier, p. 1-45.
- Vilca-Quispe, A.; Ponce-Soto, L.A.; Winck, F.V.; Marangoni, S. (2010) Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. Toxicon 55 (4), 745-753.
- Wang, M.-C; Pins, G.D.; Silver, F.H. (1995) Preparation of fibrin glue: the effects of calcium chloride and sodium chloride. Materials Science and Engineering C, v. 3, p. 131-135.
- Wang, Y.M.; Wang, S.R.; Tsai, I.H. (2001) Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. Biochem J, v.354, p.161-168.
- Ware, A.G.; Seegers, W.H. (1949) Two-stage procedure for the quantitative determination of prothrombin concentration. Am. J. Clin. Pathol. Vol. 19, p.471.

- Warrell, D.A. (1995) Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabian Peninsula. In: Meier J, White J, eds. Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 433–492.
- Warrell, D.A. (2004) Epidemiology, clinical features and management of snake bites in Central and South America. In: Campbell, J.; Lama, W.W. eds. Venomous reptiles of the western hemisphere. Ithaca: Cornell University Press, p. 709–61.
- Warrell, D.A. (2010) Snake bite. The lancet. 375(9708):77-88
- Warrell, D.A. (2012a) Venomous bites, stings, and poisoning. Infect Dis Clin North Am. 26(2):207-23.
- Warrell, D.A. (2012b) Venomous animals. Specific substances. Medicine. Volume 40, Issue 3, 159–163.
- White, J. (2005) Snake venoms and coagulopathy. Toxicon, v. 45, p. 951 - 967.
- Williams, D.; Gutiérrez, J.M.; Harrison, R.; Warrell, D.A.; White, J.; Winkel, K.D.; Gopalakrishnakone, P. (2010) Global Snake Bite Initiative Working Group; International Society on Toxinology. Lancet. 375(9708):89-91.
- Wolberg, A.S. (2007) Thrombin generation and fibrin clot structure. Blood Reviews, v. 21, p. 131-142.
- Zaganelli, G.L.; Zaganelli, M.G.M.; Magalhaes, A.; Diniz, C.R.; De Lima, E.M. (1996) Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of Jaracuçu (*Bothrops jararacussu*). Toxicon. Vol. 34, p.807-819.
- Zavaleta, A; M. Salas. (1996). Ofidismo: Envenenamiento por mordedura de serpientes. Separata Instituto Nacional de Salud. Perú.
- Zeballos, J.; Escobar, E.; Yarleque, A. (1999) Aislamiento y algunas propiedades de una fosfolipasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*. Boletín de la Sociedad Química del Perú. Vol.LXV (1)10-20.
- Zhang, Y.; Gao, R.; Lee, W.H.; Zhu, S.W.; Xiong, Y.L.; Wang, W.Y. (1998) Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom, and comparative study with other venom proteases. Toxicon. Vol. 36, p.131–142.
- Zhang, Y.; Wisner, A.; Xiong, Y.; Bon, C. (1995) A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. The Journal of Biological Chemistry, 270, 10246-10255.

VIII. ANEXO

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada Estudos comparativos da atividade cinética e trombina-símile de serinoproteases isoladas a partir dos venenos de *Bothrops brazili* e *Bothrops roedingeri*;

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição: _____

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 1932-1 / 2755-1

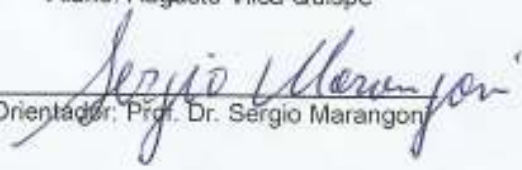
Instituição: Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/UNICAMP

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: Augusto Vilca Quispe



Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof.ª Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1932-1, sobre "Estudos comparativos da atividade cinética e trombina-símile de serinoproteases isoladas do veneno de *Bothrops brazili* e *Bothrops marajoensis*", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Sérgio Marangoni / Augusto Vilca Quispe, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 03 de setembro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1932-1, entitled "Comparative studies of the kinetic and thrombin-like activity of serine proteases isolated from *Bothrops brazili* and *Bothrops marajoensis* venom", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 3, 2009.

Campinas, 03 de setembro de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Aleniso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

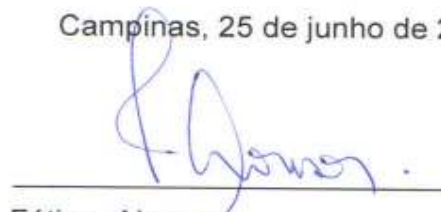
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "**ESTUDOS COMPARATIVOS DA ATIVIDADE CINÉTICA E TROMBINA-SÍMILE DE SERINOPROTEASES ISOLADAS A PARTIR DO VENENO DE *Bothrops pictus* e *Bothrops roedingeri***" (protocolo nº **2755-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Sérgio Marangoni / Augusto Vilca Quispe**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **25 de junho de 2012**.

Campinas, 25 de junho de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva